

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS: VARIABILIDADE,
SOBREVIVÊNCIA E CONTROLE DO AGENTE CAUSAL,
*Colletotrichum acutatum***

**Gabriella Souza Cintra
Engenheira Agrônoma**

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2009

T
E
S
E

/

C
I
N
T
R
A

G.
S.

2
0
0
9

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS: VARIABILIDADE,
SOBREVIVÊNCIA E CONTROLE DO AGENTE CAUSAL,
*Colletotrichum acutatum***

Gabriella Souza Cintra

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

Jaboticabal – São Paulo - Brasil

Outubro – 2009

Cintra, Gabriella Souza
C575p Podridão floral dos citros: variabilidade, sobrevivência e controle do agente causal, *Colletotrichum acutatum* / Gabriella Souza Cintra. – – Jaboticabal, 2001
xiii, 103 f. ; il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Antonio de Goes
Banca examinadora: Katia Cristina Kupper, Marcel Bellato Spósito, Eduardo Sanches Stuchi, Modesto Barreto
Bibliografia

1. *Citrus sinensis*. 2. caracterização. 3. fungicida. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 634.31..631.52

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

GABRIELLA SOUZA CINTRA - nascida em 16 de março de 1977, em Lavras, MG, é Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, em Janeiro de 2001. Na graduação, estagiou junto ao Departamento de Agricultura na área de Floricultura e Paisagismo como bolsita da Reitoria da Universidade Federal de Lavras, sob orientação do Prof. Silvério José Coelho. Em 2002, ingressou no curso de Pós-Graduação, Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob a orientação da Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta, como bolsista CNPq. Concluiu Mestrado com a dissertação intitulada “Caracterização Morfológica de Porta-enxertos de Roseira (*Rosa* spp.) e Aplicação de Análise de Agrupamento”. Prestou serviços no setor de Flores e Plantas Ornamentais junto à Empresa Grupo AM Ltda, localizada em São Paulo/SP, em 2004 e 2005. Em 2005, ingressou no curso de Pós-Graduação, Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como bolsista Capes, sob orientação do Prof. Dr. Antonio de Goes.,.

Um tempo que aprendi a entender as coisas do mar, a conversar com as grandes ondas e não discutir com o mau tempo. A transformar o medo em respeito, o respeito em confiança. Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E, para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.

(Amyr Klink)

Dedico

A meus pais, João e Eliana,
pelo amor, carinho, pela confiança e luta, para que mais uma conquista fosse alcançada. Sem nossa união, nada seria consolidado... Amo vocês...

Ofereço

Aos meus irmãos, João Renato, Renê e Marina,
pela grande amizade, pelo companherismo, pela cumplicidade, pelos sorrisos que me apoiaram nesta fase cumprida... Amo vocês...

Ao meu amor Étore,
pelo grande apoio, respeito, aprendizado, pela serenidade, que me ampararam nesta etapa vencida... Amo você...

A vocês, meu sincero amor e eterno agradecimento...

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me ilumina e se faz presente em tudo que faço. Obrigada Senhor, porque Tu nunca me abandonaste.

Ao Professor Dr. Antonio de Goes, pela orientação, pelos ensinamentos científicos e de vida, pela confiança, pelo apoio e, principalmente, pela grande amizade.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal e ao curso de Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade e ensino.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento e Pesquisa do Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Às Fazendas Citrovita e Guacho, pela concessão da área experimental e disponibilização de material que possibilitou a condução dos experimentos.

À Professora Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta, pela confiança, pelos ensinamentos e, pela grande amizade. Muito Obrigada.

Aos Professores, Dr. Modesto Barreto, Dra. Rita de Cássia Panizzi, Dra. Margarete Camargo e Dr. Jaime Maia dos Santos, pelo convívio, aprendizado e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, em especial, Lúcia Rita, Wanderlei, Rosângela, Luís Carlos, Maria Isabel e Raquel pela convivência, atenção e apoio.

Aos Professores, Dr. Antonio Sérgio Ferraud e Dr. José Carlos Barbosa, do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP, pelas sugestões e auxílio nas análises estatísticas.

Aos membros da banca examinadora pelas correções, sugestões e colaborações no trabalho.

Ao tio Luizinho, pelo grande apoio sempre, incentivo e grande amizade. Meu eterno agradecimento.

Ao tio Carlinho e a Karla, pela grande amizade, apoio e estímulos.

À tia Vera, tia Irma, tio Manoel e a sua família pela torcida e amizade.

À minha segunda família, Dona Cleide, Ana Lúcia, Marcelo, Heloísa, Vó Irma e a todos pelo amor, pela força, carinho, amizade e apoio. Muito obrigada.

À grande e verdadeira amiga, 'irmã', Taís, por sempre estar do meu lado me apoiando, muito obrigada por todo carinho e pela preciosa amizade.

À sempre amiga, Fabiana, pelo companherismo, apoio e carinho.

Às grandes amigas, Vanessa ('filha') e Ana Elisa ('Istaka'), obrigada pelo carinho, pelas conversas, pelo aprendizado, pela grande oportunidade de convívio.

Às novas amigas, Ronilda e Eliana, obrigada pelo carinho, apoio e pelos bons momentos de convivência.

Aos amigos Pedro e Fabíola, Eduardo, Renato, Gabriel, Gisele ('Gi'), Lidiane (Lidi), Fumiko, Adriana (Dri), Gleina e Flávio, Gisele ('Sô'), obrigada por todo carinho, apoio e consideração em todos os momentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fitopatologia, em especial a Rachel, Márcia, Cristiane, Davi, Patrícia, Vanessa, Elton, Andressa, Fernanda, Adriano, Ester, Marcelo, pelo aprendizado, convivência, ajuda, carinho e pelos bons momentos de divertimento.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Nematologia, em especial, Sandra e China, André, Bruno e Camila e ao Lauro por toda atenção e carinho.

Aos ex-moradores, moradores e agregados da república 'Tia Méri', pelo carinho e pelos bons momentos de convivência.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra colaboraram para o término de mais uma etapa...

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Histórico da doença Podridão floral dos citros.....	4
2.2. Etiologia e sintomatologia da Podridão floral dos citros.....	5
2.3. Ciclo de vida de <i>Colletotrichum acutatum</i> e epidemiologia da Podridão floral dos citros.....	9
2.4. Sobrevivência de <i>Colletotrichum acutatum</i>	10
2.5. Controle da Podridão floral dos citros.....	11
2.6. Modo de ação dos benzimidazóis, estrobilurinas e dicarboximidas.....	14
CAPÍTULO 2 – VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum acutatum</i> EM CITROS.....	18
RESUMO.....	18
2.1. INTRODUÇÃO.....	19
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.2.1. Origem, cultivo e preservação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	20
2.2.2. Identificação molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	22
2.2.3. Caracterização morfológica de isolados de <i>Colletotrichum acutatum</i>	24
2.2.4. Caracterização patogênica de isolados de <i>Colletotrichum acutatum</i> em variedades de plantas cítricas.....	27
2.3. RESULTADOS.....	29
2.3.1. Identificação molecular de <i>Colletotrichum</i> spp.....	29
2.3.2. Caracterização morfológica de isolados de <i>Colletotrichum acutatum</i>	30
2.3.3. Caracterização patogênica de isolados de <i>Colletotrichum acutatum</i> em variedades de plantas cítricas.....	36
2.4. DISCUSSÃO.....	39

2.5. CONCLUSÕES.....	43
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DE FONTES DE INÓCULO E SOBREVIVÊNCIA DE <i>Colletotrichum acutatum</i> EM CITROS.....	44
RESUMO.....	44
3.1. INTRODUÇÃO.....	45
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.2.1. Avaliação da população residual de <i>Colletotrichum acutatum</i> em cálices retidos, pétalas e folhas de plantas cítricas sob condições de campo.....	46
3.2.2. Avaliação da população residual de <i>Colletotrichum acutatum</i> em folhas de plantas jovens de variedades de laranja doce sob condições de casa de vegetação.....	47
3.3. RESULTADOS.....	48
3.3.1. Avaliação da população residual de <i>Colletotrichum acutatum</i> em cálices retidos, pétalas e folhas de plantas cítricas sob condições de campo.....	48
3.3.2. Avaliação da população residual de <i>Colletotrichum acutatum</i> em folhas de plantas jovens de variedades de laranja doce sob condições de casa de vegetação.....	50
3.4. DISCUSSÃO.....	51
3.5. CONCLUSÕES.....	52
CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DE FUNGICIDAS, NO CONTROLE DA PODRIDÃO FLORAL DO CITROS, CAUSADA POR <i>Colletotrichum acutatum</i> , APLICADOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE FLORESCIMENTO.....	53
RESUMO.....	53
4.1. INTRODUÇÃO.....	55
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.2.1. Descrições dos pomares.....	56
4.2.2. Tratamentos (fungicidas e fertilizantes) adotados na experimentação.....	57
4.2.3. Avaliação de fungicidas, no controle da podridão floral dos citros, causada por <i>Colletotrichum acutatum</i> , aplicados em diferentes estádios de	

florescimento, em Itapetininga/SP.....	58
4.2.4. Avaliação de fungicidas, no controle da podridão floral dos citros, causada por <i>Colletotrichum acutatum</i> , aplicados em diferentes estádios de florescimento, em Santa Cruz do Rio Pardo/SP.....	59
4.2.5. Critérios de avaliação e análises estatísticas.....	59
4.3. RESULTADOS.....	63
4.3.1. Avaliação de fungicidas, no controle da podridão floral dos citros, causada por <i>Colletotrichum acutatum</i> , aplicados em diferentes estádios de florescimento, em Itapetininga/SP, 2006.....	63
4.3.2. Avaliação de fungicidas, no controle da podridão floral dos citros, causada por <i>Colletotrichum acutatum</i> , aplicados em diferentes estádios de florescimento, em Santa Cruz do Rio Pardo/SP, 2006.....	66
4.3.3. Avaliação de fungicidas, no controle da podridão floral dos citros, causada por <i>Colletotrichum acutatum</i> , aplicados em diferentes estádios de florescimento, em Santa Cruz do Rio Pardo/SP, 2007.....	68
4.4. DISCUSSÃO.....	69
4.5. CONCLUSÕES.....	71
CAPÍTULO 5 – ATIVIDADE DE DIFERENTES FUNGICIDAS NO CONTROLE DE <i>Colletotrichum acutatum</i> EM CITROS.....	73
RESUMO.....	73
5.1. INTRODUÇÃO.....	74
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
5.2.1. Efeito pós e pré-infeccional de <i>Colletotrichum acutatum</i> aos fungicidas folpet e carbendazim.....	75
5.2.2. Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum acutatum</i> aos fungicidas carbendazim e pyraclostrobin.....	76
5.3. RESULTADOS.....	78
5.3.1. Efeito pós e pré-infeccional de <i>Colletotrichum acutatum</i> aos fungicidas folpet e carbendazim.....	78
5.3.2. Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>C. acutatum</i> aos fungicidas carbendazim e pyraclostrobin.....	85

5.4. DISCUSSÃO.....	87
5.5. CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS: VARIABILIDADE, SOBREVIVÊNCIA E CONTROLE DO AGENTE CAUSAL, *Colletotrichum acutatum*

RESUMO – Este estudo teve como objetivos: (i) identificar e caracterizar do ponto de vista genético, morfológico e patogênico isolados de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da doença Podridão floral dos citros; (ii) determinar fontes de inóculo e condições de sobrevivência deste patógeno em órgãos vegetativos; (iii) avaliar o controle da doença mediante o emprego de fungicidas, assim como os estádios de florescimento mais adequados para pulverização, em campo; (iv) avaliar o efeito pós e pré-infeccional de *C. acutatum* a fungicidas, em casa de vegetação e; (v) avaliar a sensibilidade de *C. acutatum* a fungicidas, *in vitro*. Isolados associados à PFC pertencem à espécie *Colletotrichum acutatum*. Há uma elevada variabilidade morfológica entre isolados de *C. acutatum*, indicativo de polimorfismo entre as populações. De acordo com as variáveis morfológicas avaliadas e, mediante análises exploratórias foram determinados seis grupos de isolados. Todos os estágios de florescimento, assim como a fase ‘chumbinho’ são suscetíveis a *C. acutatum*. As flores de plantas cítricas de laranjas doce ‘Pêra’, ‘Natal’, ‘Valência’, ‘Hamlin’ e ‘Folha Murcha’ mostraram-se suscetíveis a *C. acutatum*. Cálices retidos, pétalas e folhas são fontes de inóculo de *C. acutatum*. *Colletotrichum acutatum* sobrevive em cálices retidos e em folhas, no entanto, o maior número de colônias procedeu-se de cálices retidos. *Colletotrichum acutatum* sobrevive em folhas de plantas jovens. Os fungicidas sistêmicos, carbendazim, tiofanato-metílico e pyraclostrobin e o protetor folpet quando aplicados isoladamente em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ não diferiram entre si, portanto esses fungicidas tornam-se alternativas no controle da PFC. As aplicações de erradicante ou protetor nos estádios, primórdio floral e ‘cabeça-de-alfinete’ em combinação com fungicidas sistêmicos em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ não diferiu das aplicações dos sistêmicos isoladamente, assim nas condições em que os experimentos foram executados, as aplicações de erradicantes ou de protetor tornou-se dispensável. Não houve diferença entre três aplicações em ‘cabeça-de-alfinete’, ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ e, duas aplicações em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’

de carbendazim, assim como, não houve diferença entre duas aplicações em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ e uma aplicação em ‘cotonete’ de carbendazim, logo nas situações em que os experimentos foram realizados, uma única aplicação de carbendazim no estádio de ‘cotonete’ foi suficiente para o controle da doença. A aplicação de fosfito em mistura em tanque com amônia quaternária 2 (cloreto de n-alquil-benzil-dimetilamônio) e, em combinação com carbendazim não proporcionou melhor resultado quando comparado com os outros tratamentos, deste modo esta mistura não otimizou o controle da doença PFC. Sob condições controladas, a menor expressão de sintomas tanto em flores como na retenção de cálices, deu-se na aplicação dos fungicidas folpet e carbendazim em ‘cabeça-de-alfinete’ e ‘cabeça-de-fósforo’ até 48 horas antes da inoculação. Isolados de *C. acutatum* mostraram-se altamente insensíveis ao carbendazim, ao contrário de pyraclostrobin, os quais foram sensíveis.

Palavras-Chave: caracterização, *Citrus sinensis*, controle químico, fungicida, inóculo, manejo integrado.

POSTBLOOM FRUIT DROP: VARIABILITY, SURVIVAL AND CONTROL OF THE CAUSAL AGENT, *Colletotrichum acutatum*

SUMMARY - This study aimed to: (i) identify and to characterize point of view genetic, morphologic and pathogenic isolates of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of postbloom fruit drop; (ii) to determine inoculum sources and conditions for survival of this pathogen in vegetative organs; (iii) to evaluate disease control through the use of fungicides, as well as the flowering stage more suitable for spray field; (iv) evaluate the effect pos and pre-infection of *C. acutatum* to fungicides in the greenhouse and; (v) to evaluate sensitivity of *C. acutatum* to fungicide in vitro. Isolates associated with PFD belong to the specie *Colletotrichum acutatum*. There is a high morphological variability among isolates of *C. acutatum*, indicative of polymorphism among populations. According to the morphological and evaluated by exploratory analysis were determined six groups of isolates. All stages of flowering and the fruitlet are susceptible to *C. acutatum*. The flowers of citrus trees, of sweet orange 'Pera', 'Natal', 'Valencia', 'Hamlin' and 'Folha Murcha' were susceptible to *C. acutatum*. Persistent calyces, petals and leaves are sources of inoculum of *C. acutatum*. *Colletotrichum acutatum* survives in persistent calyces and in leaves, however the largest number of colonies was persistent calyces. *Colletotrichum acutatum* survives in leaves of young plants. The fungicides, carbendazim, thiophanate-methyl and pyraclostrobin and the protector folpet when applied alone in 'white bud' and 'hollow ball' did not differ, so these fungicides become alternatives to control of the PFD. The applications eradivative or protector in the stages, floral prime and 'green bud' in combination with fungicides in 'white bud' and 'hollow ball' is not different from the systemic applications alone, so the conditions under which experiments were performed, applications eradivative or protector became expendable. There was no difference between three applications in 'green bud', 'white bud' and 'hollow ball' and two applications in 'white bud' and 'hollow ball' of carbendazim, as well, no difference between two applications in 'white bud' and 'hollow ball' and an application in 'hollow ball' of carbendazim, so in situations where the experiments were performed, a single application of carbendazim in 'hollow ball' was sufficient to control the disease.

Application of phosphite in tank mix with chloride n-alkyl –benzyl –dimethylammonium in combination with carbendazim did not provide better results when compared with other treatments, so this mix is not optimized to control the disease PFD. Under controlled conditions, the lower expression of symptoms in flowers and retention of calyces, took place in the application of fungicides folpet and carbendazim in up to 48 hours before inoculation in 'green bud' and 'white bud'. Isolates *C. acutatum* were highly insensitive to carbendazim, unlike pyraclostrobin, which were sensitive.

Keywords: characterization, *Citrus sinensis*, chemical control, fungicides, inoculum, integrated management

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

O Brasil mantém-se como maior produtor mundial de laranja, sendo responsável por 32% da produção total de laranja e 50% de suco de laranja (AGRIANUAL, 2009). O Estado de São Paulo e a Flórida dominam a oferta mundial, um caso raríssimo em se tratar de *commodities* agrícola. O sistema agroindustrial citrícola gera mais de 400 mil empregos, diretos e indiretos, somente no Estado de São Paulo. Inovações em pesquisa, tecnologia e logística estão na base da eficiência e liderança do Brasil (NEVES & JANK, 2006).

A citricultura no Brasil atualmente ocupa uma área de aproximadamente 820 mil hectares, tendo o Estado de São Paulo cerca de 580 mil hectares. A colheita brasileira na safra de 2007/08¹ foi de 353 milhões de caixas (40,8 kg), das quais cerca de 85% foram destinadas à industrialização, cujo suco produzido foi exportado para vários países, incluindo-se principalmente Bélgica, Estados Unidos da América, Japão, Suíça e China. O Brasil exportou em 2007/08¹ mais de um milhão de toneladas métricas de suco de laranja, porém o preço do suco concentrado (FCO) declinou nos principais mercados. Entretanto, a exportação brasileira de suco pasteurizado em concentração natural (NFC), segue em crescimento (AGRIANUAL, 2009).

O destaque da safra encerrada no final de junho de 2008 foi o aumento do custo de produção em razão da elevação dos preços dos fertilizantes e do avanço da doença Huanglongbing (ex= *Greening*), causada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Ca. Liberibacter americanus*. O preço médio da laranja 'Pêra' destinada à indústria foi de R\$10,59/cx na safra 2007/08¹. O valor ficou 9% abaixo da média da safra anterior. A laranja 'Pêra' de mercado interno recuou 4%, passando de R\$13,82 para R\$13,25/cx (AGRIANUAL, 2009). Os produtores antecipam uma redução na produção de laranja na safra 2009/10, podendo atingir 20% em relação à safra anterior, devido a problemas

¹ Atualizado em setembro 2008

climáticos, a doenças e a falta de tratamentos culturais causada pela baixa remuneração e os altos custos dos insumos que têm prevalecido no setor (ASSOCITRUS, 2009).

As plantas cítricas podem ser afetadas por vários agentes fitopatogênicos que, agindo isoladamente ou em conjunto, sob condições favoráveis, podem tornar-se limitantes à produção. Dentre tais agentes fitopatogênicos destaca-se *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal da Podridão floral dos citros (PFC) ou Queda prematura dos frutos cítricos (QPFC). Tal doença, sob determinadas condições ambientais, constitui-se em fator limitante à produção em várias áreas citrícolas.

Os sintomas da PFC caracterizam-se pela presença de lesões de coloração laranja-amarronzada nas pétalas das flores abertas. Após a infecção das flores, os frutos recém formados caem e os cálices ficam aderidos ao disco floral e, comumente, são chamados de “estrelinhas” (FAGAN, 1984a; FEICHTENBERGER, 1991; AGOSTINI et al., 1992; TIMMER et al., 1994).

No Brasil, a doença foi descrita primeiramente no Rio Grande do Sul por DORNELLES (1977) e constatada por PORTO et al. (1979) e, atualmente ocorre em todos os Estados produtores como São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Amazonas, causando prejuízos variáveis dependendo, principalmente, da ocorrência de chuvas quando do pleno florescimento das plantas (GOES & KIMATI, 1997b).

AGOSTINI et al. (1992) descreveram três formas de *C. gloeosporioides* presentes nos citros FGG (“fast-growing gray”), SGO (“slow-growing orange”) e KLA (“key lime anthracnose”). As formas SGO e KLA, responsáveis pela produção de sintomas da podridão floral, foram reclassificados por BROWN et al. (1996) como *C. acutatum*. As formas SGO e KLA apresentam características morfológicas bem semelhantes, não facilmente distinguíveis (AGOSTINI et al., 1992). Entretanto, do ponto de vista genético são muito distintas (BROWN et al., 1996; GUERBER et al., 2003).

No Brasil, estudos referentes à identificação, caracterização e patogenicidade de *C. acutatum* em citros foram apresentados por GOES & KIMATI (1997a) e KURAMAE-IZIOKA et al. (1997). Entretanto, estudos no contexto da variabilidade dessas formas mostram-se ausentes ou escassos.

Quanto à sobrevivência de *C. acutatum* em citros, embora alguns autores tenham abordado sobre a dinâmica de populações e mecanismos de sobrevivência do fungo (DENHAM & WALLER, 1981; AGOSTINI & TIMMER, 1992; TIMMER & ZITKO, 1993; AGOSTINI & TIMMER, 1994; TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996), estudos referentes a populações residuais ainda são pouco entendidos, principalmente no que se refere à quantidade de inóculo de *C. acutatum* em órgãos vegetativos em ambiente natural e em plantas jovens.

O controle da doença baseia-se, quase que exclusivamente na aplicação de fungicidas durante o período de florescimento. Benomyl e captafol foram os mais efetivos no controle da PFC em Belize (FAGAN, 1984b). Fungicidas pertencentes aos grupos dos benzimidazóis, dicarboximidas, triazóis, folpet e misturas formuladas (estrobilurinas + triazol; oxazolidinadiona + ditiocarbamato), aplicados isoladamente ou em combinação, têm-se mostrado eficiente no controle do agente causal, *C. acutatum* (BRASIL, 2009). Entretanto, tem-se verificado na prática que, mesmo sob condições muito controladas na pulverização, muitas vezes não se tem alcançado o nível de controle desejado. Dentre alguns possíveis fatores que podem influenciar na efetividade dos tratamentos, incluem-se o fungicida, a época de pulverização e respectivo estágio de florescimento. Possíveis mudanças intrínsecas do patógeno também não podem ser descartadas.

Os fungos, por apresentarem grande maleabilidade genética, podem tornar-se resistentes a fungicidas de ação específica (KIMATI, 1995). A resistência pode ser de laboratório ou de campo. Alguns autores argumentam ter encontrado 'resistência de campo' em estudos nos quais linhagens resistentes foram, na verdade, detectadas apenas após amostras do campo terem sido submetidas à seleção subsequente por exposição ao fungicida no laboratório (BRENT, 1995). Devido à grande utilização e fatores relacionados à aplicação de fungicidas na agricultura moderna, é de se esperar que sua eficiência no campo possa diminuir em decorrência da seleção de isolados resistentes de alguns fungos.

Diante do exposto e visto a importância da PFC percebe-se a necessidade de informações básicas, porém, fundamentais, relacionadas à interação *Colletotrichum acutatum* – *Citrus* sp., bem como aspectos pertinentes ao controle da doença.

Os objetivos do presente estudo foram: (i) investigar se os sintomas de PFC verificados nas flores de plantas cítricas nos pomares do Estado de São Paulo resultam exclusivamente de apenas uma espécie de *Colletotrichum*; (ii) caracterizar morfológicamente colônias, conídios e apressórios de isolados de *C. acutatum*; (iii) caracterizar patogenicamente isolados de *C. acutatum* e avaliar o comportamento diferencial de variedades de laranjeiras doces; (iv) determinar as condições de sobrevivência no que se refere à quantidade de inóculo de *C. acutatum* em órgãos vegetativos, em ambiente natural, e a quantidade de inóculo de *C. acutatum* em folhas, em plantas novas; (v) avaliar o controle da doença mediante emprego de fungicidas de diferentes grupos químicos isoladamente ou em combinação; (vi) determinar estádios de florescimento mais adequados para pulverizações buscando o melhor controle da doença; (vii) determinar a viabilidade técnica da aplicação de fungicida protetor e, ou erradicante acompanhado ou não de aplicações subsequentes com fungicidas de diferentes grupos químicos; (viii) avaliar a atividade de fungicidas dos grupos químicos benzimidazol e carboximida na pré e pós-infecção de *C. acutatum* em casa de vegetação; (ix) avaliar a atividade dos fungicidas benzimidazol e estrobilurina na sensibilidade de *C. acutatum*, *in vitro*.

2. Revisão de Literatura

2.1. Histórico da doença Podridão floral dos citros

A Podridão floral dos citros (PFC) ou, Queda prematura dos frutos cítricos (QPFC) foi verificada pela primeira vez em 1957, em Belize, América Central, infectando principalmente laranjeiras ‘Valência’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (FAGAN, 1979). A doença foi inicialmente relatada na Argentina (SCHWARZ et al., 1978),

Colômbia e Panamá (FAGAN, 1979), República Dominicana (DENHAM, 1979), Trindade (FAGAN, 1984a), México (OROZCO SANTOS & GONZALES GARZA, 1986), Estados Unidos da América (McMILLAN Jr. & TIMMER, 1989), Costa Rica e Jamaica (TIMMER et al., 1994). Segundo TIMMER et al. (1994), a doença encontra-se presente em todas as regiões tropicais e subtropicais úmidas das Américas.

No Brasil, a PFC foi relatada inicialmente no Rio Grande do Sul (DORNELLES, 1977) e constada por PORTO et al. (1979) e, presentemente, ocorre em praticamente todos os Estados produtores como São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Amazonas, causando prejuízos variáveis dependendo, principalmente, da ocorrência de chuvas, quando do pleno florescimento das plantas (GOES & KIMATI, 1997b).

No Estado de São Paulo, perdas significativas devido a PFC, ocorreram na safra 1977/78 em muitos pomares, principalmente nas regiões de Limeira, Araraquara, Taquaritinga e Cândido Rodrigues (FEITCHENBERGER, 1991). Na safra de 1990/91, foram verificadas perdas de produção em pomares localizados nos municípios de Limeira, Campinas, Mogi Guaçu, Araras e Pirassununga, enquanto que nas safras de 1991/92, 1992/93 e 1993/94 a enfermidade afetou de forma severa as principais regiões produtoras paulistas, causando perdas de até 80% (FEICHTENBERGER, 1994; PRATES et al, 1995; GOES & KUPPER, 2002).

Em condições extremamente favoráveis ao desenvolvimento do fungo, as perdas de produção podem chegar em até 100% (TIMMER, 1993). Devido à baixa taxa de fixação de frutos em relação à quantidade de flores formadas, assim como às perdas causadas por quedas naturais e outros fatores, estima-se que 5 a 6 frutos sejam perdidos para cada 100 cálices retidos, resultantes de infecções do fungo causal (TIMMER & ZITKO, 1995).

2.2. Etiologia e sintomatologia da Podridão floral dos citros

O fungo agente causal da PFC é *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, cuja fase teleomórfica é *Glomerella acutata*, ainda não encontrada na natureza. Foi descrito

originalmente como uma estirpe virulenta de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (FAGAN, 1979).

FAGAN (1980), estudando a patogenicidade, a taxa de crescimento sob diferentes temperaturas e as características culturais de diversos isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cálices, de pétalas infectadas e de folhas, em Belize, constatou a ocorrência de três diferentes formas do fungo, designadas *cgm*, *cgc* e *cgp*. Verificou que as formas *cgm* e *cgc* mostraram-se não patogênicas quando inoculadas em flores de plantas cítricas, enquanto que a forma *cgp* revelou-se patogênica.

SONODA & PELOSI (1988) avaliaram isolados de *C. gloeosporioides* de citros na Flórida de acordo com o aspecto, crescimento da colônia e resistência ao benomyl. Os autores descreveram duas formas, uma de crescimento rápido, coloração cinza e mais sensível ao benomyl e outra de crescimento lento, coloração laranja e menos sensível ao benomyl.

AGOSTINI et al. (1992) descreveram três formas de *C. gloeosporioides* presentes nos citros, que foram denominadas de acordo com as características morfológicas e patogênicas, como FGG (“fast-growing gray”), SGO (“slow-growing orange”) e KLA (“key lime anthracnose”). A linhagem FGG apresenta crescimento rápido em meio de cultura e coloração acinzentada, conídios grandes com as extremidades arredondadas e, geralmente, está presente na forma quiescente (SONODA & PELOSI, 1988; AGOSTINI et al., 1992; TIMMER et al., 1994; GOES & KIMATI, 1997a; TIMMER & BROWN, 2000) causando infecções em ramos, folhas e em frutos tanto em pré como em pós-colheita (FAWCETT, 1936; BROWN, 1975). A linhagem SGO apresenta crescimento lento em meio de cultura, colônias com pigmentação alaranjada, conídios menores com as extremidades pontiagudas e apressórios clavados, enquanto a linhagem KLA, associada à antracnose do limão ‘Galego’ (*C. aurantifolia* (Swingle)), apresenta características semelhantes à SGO, porém com apressórios menores e arredondados.

Sintomas típicos da podridão floral foram obtidos em flores de laranja ‘Valência’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck) e de ‘Lima da Pérsia’ (*C. limettiioides* Tanaka) somente através da inoculação dos isolados do tipo SGO e KLA (SONODA & PELOSI, 1988; AGOSTINI

et al., 1992; TIMMER et al., 1994; GOES & KIMATI, 1997a; TIMMER & BROWN, 2000). A forma SGO, responsável pela PFC, possivelmente teve sua origem na Flórida, de uma adaptação da forma KLA (AGOSTINI et al., 1992).

LIYANAGE et al. (1992), através da utilização de marcadores moleculares, verificaram que as duas populações de *C. gloeosporioides* presentes em laranja doce e lima ácida 'Tahiti' (*C. aurantifolia* Osbeck) apresentavam características genéticas distintas. Em estudo posterior, LIYANAGE et al. (1993) observaram diferenças na enzima cutinase entre as formas SGO e FGG, assim como GANTOTTI & DAVIS (1991) observaram diferenças em diversas outras enzimas.

BROWN et al. (1996), posteriormente, através de testes de patogenicidade, confirmaram, inicialmente, que os isolados de SGO infectavam somente flores de laranja doce, os isolados de KLA afetavam tanto flores de laranja doce como folhas de limão 'Galego', enquanto que os isolados de FGG não causavam infecção em nenhum dos hospedeiros. Através de PCR com *primers* específicos para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, e através do sequenciamento da região ITS do rDNA, os isolados SGO e KLA, causadores da podridão floral, foram então reclassificados como *C. acutatum* e os isolados FGG como *C. gloeosporioides*.

KURAMAE-IZIOKA et al. (1997) observaram polimorfismo entre os isolados mediante análises de RAPD, e dividiram os isolados em dois grupos, grupo 1 correspondendo à forma FGG e grupo 2 vinculado à forma SGO.

GOES & KIMATI (1997a), em estudo com isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* de citros provenientes de várias regiões do Brasil verificaram a existência das mesmas formas descritas por AGOSTINI et al. (1992), constatando que é possível separar os grupos SGO, KLA e FGG em função do formato predominante dos apressórios e de suas dimensões. Em relação às características patogênicas, GOES & KIMATI (1997b) confirmaram que apenas os isolados SGO e KLA causaram sintomas de podridão floral quando inoculados em flores de laranjeira 'Pêra'.

Colletotrichum acutatum, agente causal da PFC produz conídios que apresentam, em sua maioria, uma das extremidades fusiforme e a outra arredondada e são menores que os conídios de *C. gloeosporioides*. Este patógeno raramente produz

setas e forma apressórios clavados (AGOSTINI et al., 1992; TIMMER, et al., 1994; GOES & KIMATI, 1997a). Além disso, isolados de *C. acutatum* mostraram-se insensíveis ao benomyl *in vitro*, constituindo-se um meio semi-seletivo para diferenciar *C. acutatum* de *C. gloeosporioides* (SONODA & PELLOSI, 1988; GOES & KIMATI, 1998; PERES et al., 2002).

Os sintomas de PFC mostram-se evidentes inicialmente nas flores abertas. As flores infectadas apresentam manchas de coloração marrom ou pêssego que posteriormente podem apresentar tonalidade salmão-róseo devido à formação de frutificações do fungo (acérvulos) na superfície. Quando em ataques severos, estas podem ocorrer antes mesmo da abertura dos botões florais, provocando um completo crestamento (TIMMER et al., 1994). As pétalas afetadas permanecem firmemente aderidas ao disco basal, adquirem consistência rígida e seca e de coloração rosa pardo (TIMMER et al., 1994; TIMMER & BROWN, 2000). Os frutos recém formados ficam amarelados e caem rapidamente, enquanto que os discos basais, cálices e pedúnculos ficam fortemente aderidos aos ramos e recebem o nome de “estrelinhas” (FAGAN, 1984a; FEICHTENBERGER, 1991; AGOSTINI et al., 1992). Estas “estrelinhas” podem permanecer aderidas aos ramos por até 18 meses, cujas plantas, quando com muitos cálices do ano anterior, não florescem e comportam-se como se estivessem suportando frutos, podendo também comprometer a florada seguinte (FEICHTENBERGER, 1991). As folhas ao redor da inflorescência doente são frequentemente pequenas, deformadas, com nervuras grossas, dando aos ramos uma aparência de roseta (TIMMER et al., 1994; TIMMER & BROWN, 2000). Associado a isso, ramos contendo cálices retidos apresentam alterações fisiológicas significativas, resultantes do desbalanço nutricional (GOES & CRESTE, 2000) e efeitos hormonais (TIMMER & BROWN, 2000; CHUNG et al., 2002; CHUNG et al., 2003; LI et al., 2003).

2.3. Ciclo de vida de *Colletotrichum acutatum* e epidemiologia da Podridão floral dos citros

A sobrevivência do fungo *C. acutatum* dá-se por meio de apressórios formados na superfície de folhas, ramos e cálices retidos. Em condições de molhamento prolongado e presença de nutrientes encontrados em pétalas, o apressório germina e emite uma hifa sobre a cutícula da folha, dando origem aos primeiros conídios, sem a formação de acérvulo. Com o surgimento de novas flores, os conídios livres na superfície das folhas e cálices retidos são dispersos por respingos de água e atingem as pétalas onde penetram diretamente, sem a formação de apressório. Os conídios de *C. acutatum* são produzidos em abundância nos acérvulos em flores infectadas e disseminados pelos respingos de água para flores sadias durante o período de floração. Quando na ausência de flores, o ciclo reinicia na sobrevivência em folhas, cálices retidos e ramos (TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996). Aparentemente, apressórios da forma SGO perdem a viabilidade com o tempo, ocorre um declínio gradual de algumas populações desta forma com a ausência de flores (AGOSTINI & TIMMER, 1992). Então, *C. acutatum* comporta-se em citros como necrotrófico durante o curto período de florescimento, no entanto, por muitos anos, o fungo pode viver biotroficamente na forma de apressórios, como infecções quiescentes em tecidos vegetais (AGOSTINI & TIMMER, 1994; ZULFIQAR et al., 1996; PERES et al., 2005).

A doença PFC está associada à alta umidade. Períodos prolongados de chuvas, orvalho e neblina favorecem o desenvolvimento de epidemias, fazendo com que os conídios produzidos nas inflorescências se disseminem rapidamente por toda a planta e, ou, para as plantas vizinhas (DENHAM & WALLER, 1981; TIMMER & ZITKO, 1993). As chuvas com ventos carregam as gotas de água juntamente com os conídios, aumentando assim a dispersão lateral (AGOSTINI et al., 1993).

Quanto à temperatura, verifica-se que esta não é tão importante quanto o molhamento para a infecção do patógeno. A faixa ótima de temperatura para o crescimento de *C. acutatum* 'in vitro' está entre 23°C e 27°C (AGOSTINI et al., 1992; GOES, 1995; PERES, 1998). Porém, o fungo desenvolve-se mesmo em temperaturas

abaixo de 15°C (TIMMER et al., 1994). Apesar das baixas temperaturas reduzirem o desenvolvimento da doença em campo, estas reduzem também o desenvolvimento da florada, podendo prolongar o período em que as flores estão suscetíveis às infecções (TIMMER, 1993; TIMMER et al., 1994).

A PFC afeta praticamente todas as variedades de citros de interesse comercial. Estudos de patogenicidade com flores de laranja-doce, limão 'Galego', 'lima da Pérsia' e tangelo 'Orlando' demonstraram haver pequena variação na suscetibilidade de pétalas dessas variedades ao *C. acutatum* (AGOSTINI et al., 1992; BROWN et al., 1996; GOES & KIMATI, 1997b; PERES et al., 2008).

Segundo TIMMER et al. (1994), as condições que propiciam a ocorrência de mais de uma florada, e, ou variedades que florescem mais de uma vez por ano, favorecem a ocorrência da doença. Em razão disso as perdas são geralmente mais severas em regiões tropicais e em variedades com múltiplas floradas. No Brasil, a doença é mais severa em limões verdadeiros (*C. limon* (L.) Burm.), nas limas ácidas 'Tahiti' e 'Galego' e na laranja 'Pêra', espécies essas que apresentam vários surtos de floração (FEICHTENBERGER, 1991).

No Estado de São Paulo, as epidemias são freqüentes e podem causar perdas em quase todos os anos (PERES et al., 2002). Na Flórida, a doença pode causar sérias epidemias em alguns anos e praticamente nenhuma perda em outros anos, enquanto em áreas de clima tropical úmido, como Belize, sul do México e Costa Rica, a doença chega a ser um fator limitante para a produção dos citros (FAGAN, 1979; OROZCO SANTOS & GONZÁLES GARZA, 1986; TIMMER & BROWN, 2000; PERES et al., 2002).

2.4. Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum*

A espécie *C. acutatum* apresenta formas diversificadas quanto a sua sobrevivência. Dentre essas incluem-se a sobrevivência em tecidos vivos das plantas (AGOSTINI et al., 1992; AGOSTINI & TIMMER, 1994; TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996; ADASKAVEG & FÖRSTER, 2000; LEANDRO et al., 2001; DeMARSAY &

OUDEMANS, 2003; LEANDRO et al., 2003a; LEANDRO et al., 2003b; DeMARSAY & OUDEMANS, 2004), em hospedeiros alternativos (FREEMAN et al., 2000; FREEMAN et al., 2001; HOROWITZ et al., 2002) e no ambiente (EASTBURN & GUBLER, 1990; NORMAN & STRANDBERG, 1997; UREÑA-PADILLA et al., 2001; FREEMAN et al., 2002).

Em PFC, a sobrevivência de *C. acutatum* dá-se na forma de apressórios como infecções quiescentes. Estes apressórios formados em tecidos maduros são essenciais para sobrevivência de *C. acutatum* (AGOSTINI et al., 1992; AGOSTINI & TIMMER, 1994; TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996).

As formas FGG e SGO comportam-se completamente diferentes na superfície de folhas de citros. Apressórios da forma FGG produzem infecções quiescentes que se desenvolvem somente quando o tecido da folha está debilitado ou senescente. Os apressórios dessa forma não respondem à umidade ou a nutrientes como extratos de pétalas. Ao contrário, apressórios da forma SGO germinam e produzem hifa e conídio na superfície da folha quando na presença de umidade e extratos de pétalas (TIMMER et al., 1994).

De acordo com DENHAM & WALLER (1981), a forma SGO sobrevive sob tecidos vivos, forma apressórios e produz infecções quiescentes semelhantes à forma FGG.

AGOSTINI & TIMMER (1994) mediante estudos da dinâmica populacional e sobrevivência, conduzidos sob condições de campo, em laboratório e em casa de vegetação, observaram que a população da forma SGO declinou após o período de florescimento. De acordo com os autores, possivelmente não houve reprodução dessa forma em tecidos mortos. Além disso, a baixa população de propágulos indicou uma baixa capacidade saprofítica dessa forma em tecidos mortos, contrariamente para a forma FGG, que manteve-se estável durante o ano inteiro.

2.5. Controle da Podridão floral dos citros

O controle da PFC fundamenta-se basicamente em pulverização com fungicidas na época da florada (DENHAM, 1979; FAGAN, 1984b).

No Brasil, diversos estudos demonstraram que os fungicidas benomyl e captafol, aplicados isoladamente ou em combinações variadas, foram considerados como um dos produtos mais eficientes para o controle da doença (PORTO et al., 1979; SOUZA FILHO et al., 1979; PORTO, 1981a, 1981b; ROSSETTI et al., 1981; MELO & MORAIS, 1991; GOES et al., 2000; ROBERTO & BORGES, 2001). Resultados semelhantes foram também observados na Flórida, Estados Unidos da América (McMILLAN Jr, 1991; TIMMER & ZITKO, 1991, 1992, 1996; PERES et al., 2002). Entretanto, o uso de tais fungicidas foi proibido desde as décadas de 80 e 90, do século passado. Outros fungicidas também citados com a mesma finalidade foram o thiabendazole e chlorothalonil (DENHAM, 1989).

Os fungicidas carbendazim, difenoconazole, trifloxystrobin, folpet, mancozeb, ditiocarbamato, aplicados isoladamente ou em combinação, têm-se mostrado eficiente no controle da doença (GOES et al., 2000; PERES et al., 2002; GALLI et al., 2002; GOES et al., 2008).

O longo período de exposição das flores, associado a um período crítico de infecção relativamente curto e longos períodos de chuva durante o florescimento dificultam o planejamento e a execução das pulverizações. Quando sob condições ambientais favoráveis há uma elevada reprodução do patógeno, com conseqüente expressão de sintomas. Nessas circunstâncias, a doença manifesta-se de forma exponencial, o que não permite atraso na execução de programas de controle, mesmo quando são utilizados fungicidas adequados (GOES et al., 2008).

Tem-se observado que a eficiência de um programa de controle da doença não é constante todos os anos, independente das combinações dos fungicidas avaliados (PORTO, 1981a; PORTO, 1981b). Nesse aspecto, para a tomada de decisão deve-se levar em conta o histórico da doença na área, as condições ambientais, o estágio de desenvolvimento da flor, a capacidade operacional, a variedade e o potencial histórico de produtividade.

Um modelo de previsão para determinar a possibilidade de ocorrência da doença e auxiliar na aplicação de fungicidas foi desenvolvido na Flórida (TIMMER & ZITKO, 1993). O modelo baseia-se, originalmente, no número de flores com sintomas por

árvores e na quantidade de chuva durante os últimos cinco dias. Posteriormente, este modelo foi modificado para incluir a quantidade de horas de molhamento foliar após a ocorrência de chuvas (TIMMER & BROWN, 2000; TIMMER et al., 2002). PERES et al. (2002), também desenvolveram um modelo de previsão para controle da podridão floral nas condições de Itapetininga/SP, Brasil, visando, essencialmente, a quantidade de inóculo disponível no pomar.

GOES et al. (2008) verificaram que o controle da PFC foi efetivo nas regiões de Rincão/SP e Santa Cruz do Rio Pardo/SP, quando utilizados os fungicidas carbendazim e folpet, e que uma única aplicação em flor aberta não controla a doença, indicando que o fungicida deve ser aplicado antes, nas fases designadas 'cabeça-de-fósforo' e em 'cotonete'.

O controle da doença pode ser implementado na forma preventiva, mesmo quando são utilizados fungicidas sistêmicos. A baixa temperatura, durante o período de floração, pode prorrogar o florescimento por até 60 dias. Este prolongamento do período de florescimento é favorável para o desenvolvimento do patógeno, principalmente, quando da presença de flores abertas nas plantas. Nestas circunstâncias, e especialmente com elevada pressão de inóculo e condições ambientais favoráveis, a aplicação de fungicidas protetores durante o florescimento é essencial. A aplicação de fungicida protetor seguido de sistêmico, em etapas posteriores, mostrou reduções significativas da doença em campo. O fungicida protetor aplicado isoladamente possivelmente reduz a população do patógeno que sobrevive em infecções quiescentes (GOES et al., 2008).

Atualmente os fungicidas registrados para o controle de *C. acutatum* são os pertencentes aos grupos químicos dos fungicidas benzimidazóis (carbendazim e tiofanato metílico), triazóis (difenoconazole e tebuconazole), dicarboximida (folpet) e misturas formuladas (estrobilurinas + triazol; oxazolidinadiona + ditiocarbamato) (BRASIL, 2009).

2.6. Modo de ação dos fungicidas benzimidazóis, estrobilurinas e dicarboximidas

O início da aplicação de fungicidas em larga escala para o controle de doenças em plantas está vinculado à descoberta da calda bordalesa por Millardet, em 1882. A partir de 1960, o controle químico de doenças de plantas assistiu grandes mudanças, principalmente com a ampla aceitação de fungicidas sistêmicos (EDGINGTON et al., 1980).

A grande capacidade seletiva e especificidade dos fungicidas sistêmicos curativos, que lhes permitem aumentar sua eficiência em relação aos fungicidas protetores e erradicantes, é, ao mesmo tempo, a causa de sua vulnerabilidade. Os fungos, por apresentarem grande maleabilidade genética, podem tornar-se resistentes a esses fungicidas de ação específica. Em condições de laboratório, podem se conseguir mutantes de todos os fungos, resistentes a todos os fungicidas sistêmicos já testados (KIMATI, 1995).

A pressão de seleção exercida sobre a população do fungo é, provavelmente, o fator mais importante envolvido na seleção da resistência. Quanto maior a pressão de seleção contra a população original (selvagem), mais rápida será a substituição desta por indivíduos resistentes. Altas pressões de seleção, assim, anulam a competição por sítios de infecção, como consequência, anulam qualquer eventual desvantagem seletiva que possam ter os indivíduos resistentes. Dentre os principais fatores que levam a uma maior pressão de seleção estão: (i) maior eficiência do fungicida, (ii) maior frequência de aplicação do fungicida, (iii) melhor cobertura e maior persistência do fungicida, (iv) maior diferença em sensibilidade entre indivíduos resistentes e sensíveis e, (v) menor ingresso e/ou manutenção de indivíduos sensíveis na área considerada (GHINI & KIMATI, 2000; BERGAMIN FILHO & AMORIM, 2001).

Com base nesses fatores, várias medidas são recomendadas para diminuir o risco de seleção de indivíduos resistentes numa determinada área, como: (i) evitar tratamentos repetitivos com o mesmo fungicida; (ii) usar misturas formuladas; (iii) alternar produtos apropriados; (iv) limitar o número de aplicações; (v) espaçar as aplicações no tempo; (vi) evitar uso erradicante ou curativo do fungicida; (vii) usar o

fungicida como protetor; (viii) usar dosagem recomendada; (ix) integrar o tratamento químico com táticas de controle não-químicas (HEANEY et al., 1994; BRENT, 1995; BRENT & HOLLOMON, 1998; KENDALL & HOLLOMON, 1998).

Dos diversos fatores que podem influenciar a origem e a posterior seleção de mutantes resistentes a fungicidas, pode-se citar: (i) grupo químico; (ii) frequência de mutação; (iii) eficiência do fungicida; (iv) frequência de aplicação; (v) cobertura do fungicida na planta; (vi) diferença de sensibilidade entre populações sensíveis e resistentes (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 2001).

Os mecanismos que conferem resistência aos fungicidas diferem nos termos, resistência qualitativa e resistência quantitativa. Geralmente, linhagens fúngicas resistentes originam-se por meio de mutação. A frequência de aparecimento de mutantes resistentes é função, principalmente, do grupo químico a que pertence o fungicida em questão: há grupos que agem em uma ou poucas rotas metabólicas do fungo, conferindo o surgimento da resistência qualitativa; ao contrário de outros, que agem em múltiplas rotas metabólicas, em que a resistência é quantitativa. Outros dois fatores contribuem para a ocorrência de mutantes resistentes: tamanho da população do fungo no momento da aplicação, onde, quanto maior a população, maior a chance de ocorrência de mutantes resistentes e, presença de reprodução sexual, já que essa pode aumentar a ocorrência de indivíduos resistentes (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 2001).

O citoplasma de células eucarióticas é suportado por uma estrutura tridimensional de filamentos denominados de citoesqueleto. Estes filamentos são divididos em três grupos: microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos. Os microtúbulos são constituídos de duas proteínas tubulares, a alfa e a beta-tubulina. Os fungicidas benzimidazóis afetam especificamente a divisão celular pela inibição da biossíntese da beta-tubulina. Assim, a formação dos microtúbulos, formadores do fuso mitótico é distorcida, prejudicando a divisão celular e nuclear, essencial ao crescimento micelial e produção de esporos (HASSAL, 1990; KENDALL et al., 1994; BRENT, 1995; WHEELER et al., 1995).

As estrobilurinas agem através da inibição da respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre os citocromos *b* e *c1*. A interferência exercida pelo fungicida impede a liberação de energia e a produção de ATP (BRENT, 1995; KOELLER, 1998; LEROUX, 1996; YPEMA & GOLD, 1999).

O principal mecanismo de fungitoxicidade dos fungicidas de ação não-específica, como por exemplo, as dicarboximidas é de atuar no resíduo da tiol cisteína e no bloqueio de resíduos essenciais de cisteína (KOELLER, 1998).

A resistência pode ser de laboratório ou de campo, se as linhagens resistentes do fungo são observadas em meio de cultura contendo fungicida ou em plantas. Observações de resistência geradas em laboratório e a detecção de linhagens raras ou fracamente resistentes no campo foram mal interpretadas por pesquisadores ou por competidores comerciais em algumas ocasiões, indicando como falhas reais ou iminentes da performance prática de um produto, quando de fato, um bom controle ainda estava sendo garantido. Alguns autores argumentam ter encontrado 'resistência de campo' em estudos nos quais variantes resistentes foram, na verdade, detectados apenas após amostras do campo terem sido submetidas à seleção subsequente por exposição ao fungicida no laboratório (BRENT, 1995).

Quando um mesmo fator genético governa a resistência e/ou sensibilidade a dois ou mais fungicidas, tem-se a resistência cruzada. Existe ainda a resistência múltipla, onde fatores genéticos diferentes conferem resistência a dois ou mais fungicidas com mecanismos de ação distintos (GHINI & KIMATI, 2000).

Os primeiros registros de patógenos que mostraram-se resistentes a fungicidas foram: *Pyrenophora avenae* a organomercuriais, *Venturia inaequalis* e *Botrytis cinerea* a benzimidazóis, *Phytophthora infestans* e *Plasmopara viticola* a fenilamidas, *Botrytis cinerea* a dicarboximidas, *Blumeria graminis* a DMI's, *Ustilago nuda* a carboxanilidas, *Blumeria graminis* a morfolinas e *Blumeria graminis* a estrobilurinas (HEWITT, 1998).

Colletotrichum acutatum em citros demonstrou baixa sensibilidade ao benomyl *in vitro* (SONODA & PELOSI, 1988; RODRIGUES & LEON, 1993; GOES & KIMATI, 1998; PERES et al., 2002; PERES et al., 2004). PERES et al. (2002) concluíram que o

benomyl não restringe a produção de conídios em tecidos sintomáticos infectados, porém ele reduz a viabilidade de inóculo existente.

Segundo BRENT (1986 e 1994), o monitoramento da resistência envolve diversas fases e atividades. Visa prever o seu aparecimento, investigar suspeitas de sua ocorrência prática, avaliar estratégias que possam evitá-la, acompanhar o seu comportamento ao longo do tempo, orientar a seleção e uso de fungicida e avançar o conhecimento sobre o assunto (BRENT, 1986).

Os fungos, por apresentarem grande maleabilidade genética, podem tornar-se resistentes a fungicidas de ação específica (KIMATI, 1995). Devido à grande utilização e fatores relacionados à aplicação de fungicidas na agricultura moderna, é de se esperar que sua eficiência no campo possa diminuir em decorrência da seleção de isolados resistentes de alguns fungos.

CAPÍTULO 2 – VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum acutatum* EM CITROS

Resumo - A doença PFC causada por *Colletotrichum acutatum* é considerada um sério problema principalmente nas regiões úmidas onde se produz citros. Entretanto, aspectos relacionados à caracterização do patógeno têm sido contestados. Isolados de *C. acutatum* oriundos de flores sintomáticas de variedades de citros de diferentes regiões foram identificados mediante PCR com *primers* taxon-específicos, caracterizados quanto à coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença de setores, índice de crescimento micelial, diâmetro das colônias, esporulação, morfologia dos conídios e apressórios e, avaliados quanto à patogenicidade e comportamento de variedades. Posteriormente, foram realizadas análises exploratórias, a fim de agrupar os isolados avaliados. Os estudos de PCR realizados com o *primer* específico para *C. acutatum*, CgInt2, confirmaram a identidade dos isolados como pertencentes à espécie *Colletotrichum acutatum*. Mediante as análises morfológicas, observou-se ampla variabilidade entre os isolados de *C. acutatum*, apenas os conídios e apressórios apresentaram o mesmo formato para todos os isolados, indicando, portanto, polimorfismo entre populações de *C. acutatum*. Testes de patogenicidade revelaram que todos os estádios florais e a fase de ‘chumbinho’ mostraram-se suscetíveis ao patógeno, com variações nas infecções. Flores de plantas cítricas das variedades de laranjas doce ‘Pêra’, ‘Natal’, ‘Valência’, ‘Hamlin’ e ‘Folha Murcha’ são suscetíveis a *C. acutatum*. As análises de agrupamentos e componentes principais permitiram identificar seis grupos de isolados segundo as variáveis morfológicas. Através das análises exploratórias observou-se que, *In vitro*, isolados provenientes de uma mesma variedade e mesma região geográfica podem apresentar diferentes características morfológicas, assim como isolados de diferentes variedades e regiões podem apresentar características diferentes.

Palavras-chave: Podridão Floral dos Citros, *Citrus sinensis*, caracterização.

2.1. Introdução

O fungo agente causal da Podridão floral dos citros (PFC) ou Queda prematura dos frutos cítricos (QPFC) é *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, descrito originalmente como uma estirpe virulenta de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (FAGAN, 1979).

As flores infectadas por *C. acutatum* apresentam manchas de coloração marrom ou pêssego que, posteriormente, podem tornar-se de tonalidade salmão-róseo. Quando em ataques severos, essas lesões podem ocorrer antes mesmo da abertura dos botões florais (TIMMER et al., 1994). As pétalas afetadas permanecem firmemente aderidas ao disco basal, adquirem consistência seca e rígida e apresentam coloração rosa pardo (TIMMER et al., 1994; TIMMER & BROWN, 2000). Os frutos recém formados ficam amarelados e caem rapidamente, enquanto que, os discos basais, cálices e pedúnculos ficam mais fortemente aderidos aos ramos e recebem o nome de “estrelinhas” (FAGAN, 1984a; FEICHTENBERGER, 1991; AGOSTINI et al., 1992).

AGOSTINI et al. (1992) descreveram três formas de *C. gloeosporioides* presentes nos citros, FGG (“fast-growing gray”), SGO (“slow-growing orange”) e KLA (“key lime anthracnose”). A forma FGG apresenta crescimento rápido em meio de cultura e coloração acinzentada, conídios grandes com as extremidades arredondadas e, geralmente, presente na forma quiescente. As formas SGO e KLA apresentam características morfológicas bem parecidas, difíceis de distingui-las, crescimento lento em meio de cultura, colônias com pigmentação alaranjada, conídios menores com uma das extremidades de formato obtuso e apressórios clavados, no caso de SGO, e arredondados para KLA.

BROWN et al. (1996), através de testes de patogenicidade confirmaram que os isolados da forma SGO infectavam somente flores de laranja doce, enquanto os do tipo KLA afetavam tanto flores de laranja doce como folhas de limão ‘Galego’. Por outro lado, isolados das formas FGG não causavam infecção em nenhum dos hospedeiros. Segundo esses autores, mediante PCR e sequenciamento da região ITS do rDNA, os

isolados SGO e KLA foram então reclassificados, como *C. acutatum*, enquanto os isolados FGG foram identificados como *C. gloeosporioides*.

KURAMAE-IZIOKA et al. (1997), estudaram aspectos morfológicos, patogênicos e moleculares de *Colletotrichum* em citros e classificaram os isolados em dois grupos, provavelmente formados por *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Entretanto, nesses estudos além de se contemplar apenas um pequeno número de isolados, foram analisadas duas formas de *Colletotrichum*.

Os objetivos do presente estudo foram: (i) investigar a possível ocorrência de mais de uma espécie de *Colletotrichum* associada aos sintomas da podridão floral dos citros em flores coletadas em regiões produtoras do Estado de São Paulo, com histórico da doença; (ii) caracterizar morfológicamente colônias, conídios e apressórios de isolados de *C. acutatum*; (iii) caracterizar patogenicamente isolados de *C. acutatum* e avaliar o comportamento diferencial de variedades inoculadas e (iv) identificar e caracterizar grupos de isolados formados mediante análises exploratórias.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Origem, cultivo e preservação dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Foram coletadas flores e botões florais com sintomas típicos de Podridão floral dos citros, nos anos de 2007 e 2008, das variedades de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), Pêra (P), Natal (N), Valência (V), Folha Murcha (FM), Lima (L), Lima Verde (LV), Baía (B) e Hamlin (H), sendo colhida apenas uma flor sintomática de cada planta. A procedência dos isolados foi de pomares localizados nos municípios de Itapetininga (I), Santa Cruz do Rio Pardo (S) e Brotas (B), no Estado de São Paulo (Tabela 1). Tais localidades foram selecionadas mediante os antecedentes históricos da doença nessas áreas.

Tabela 1. Relação dos isolados de *Colletotrichum acutatum* avaliados na identificação molecular, caracterização morfológica e caracterização patogênica.

Designação dos isolados				
P2B*	V10B*	LV6B*	P3I	V12I
P3B**	FM1B**	LV7B	P4I	V13I*
P5B	FM2B	LV8B	P5I*	P1S
P6B	FM3B	LV9B	P6I	P2S
P7B**	FM4B	LV10B	P9I	P3S
P8B	FM5B	B1B	P10I	P5S
P10B	FM6B	B2B**	P11I**	P6S*
N1B*	FM7B*	B3B	P12I	P8S*
N2B	FM8B	B4B	P14I	P10S**
N3B	FM9B	B5B*	N1I	P12S
N4B	FM10B*	B6B	N2I	N1S*
N5B	L1B	B7B**	N3I*	N2S*
N6B*	L2B	B8B	N4I	N3S
N7B	L3B	B9B	N5I	N4S**
N8B	L4B	B10B	N6I	N6S
N9B**	L5B**	H1B	N7I*	N7S
N10B	L6B	H2B*	N8I	N10S
V1B	L7B*	H3B*	N9I	V1S
V2B	L8B	H4B	N10I	V2S
V3B*	L9B*	H5B	N11I**	V5S**
V4B	L10B	H6B	V4I*	V6S
V5B	LV1B	H7B	V5I	V7S
V6B	LV2B*	H8B	V8I	V8S
V7B**	LV3B**	H9B	V9I**	V9S*
V8B	LV4B	H10B**	V10I	V10S*
V9B	LV5B	P2I*	V11I	V11S

P: 'Pêra'; N: 'Natal'; V: 'Valência'; FM: 'Folha Murcha'; L: Lima; LV: 'Lima Verde'; B: 'Baía'; H: 'Hamlin'.
B: Brotas; I: Itapetininga; S: Santa Cruz do Rio Pardo.

* isolados avaliados na caracterização morfológica

** isolados avaliados na caracterização morfológica e patogênica

O isolamento foi efetuado retirando-se fragmentos de pétalas de pelo menos 100 flores sintomáticas, de cada variedade e local, que passaram por uma desinfestação

superficial em álcool etílico durante 30 segundos e, hipoclorito de sódio por 30 segundos, seguido de lavagem em água destilada esterilizada. Os tecidos desinfestados foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar), seguido de incubação durante 10 dias a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. A partir de culturas puras, foram obtidas culturas monospóricas, seguido do seu armazenamento e preservação em água destilada, segundo o Método CASTELLANI (1939).

2.2.2. Identificação molecular de isolados de *Colletotrichum* spp.

Um total de 130 isolados de *Colletotrichum* sp. foram selecionados para a identificação molecular (Tabela 1). Estes foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250mL contendo meio de cultura líquido batata-dextrose (BD), onde foi depositado um disco de colônia de cada um dos isolados, que foi cultivado por 15 dias a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz contínua. Após esse período foi feita a separação rápida do mesmo do meio de cultura, através de peneiras de pequena trama. Em seguida o micélio foi lavado com água destilada, escorrido e colocado para secar a temperatura ambiente, por cerca de 8 horas. Após a secagem procedeu-se a sua maceração empregando-se nitrogênio líquido.

O pó seco obtido na maceração foi posteriormente depositado em tubos do tipo Eppendorf e estocados a -20°C .

As extrações de DNA foram baseadas no protocolo de KURAMAE-IZIOKA et al. (1997), com alguns ajustes a fim de se otimizar a extração. A cada tubo Eppendorf foram acrescentados 750 μL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 100mM e SDS 0,5%). Os tubos foram mantidos em banho-maria a $60-65^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Após serem retirados do banho-maria, foram acrescentados aos tubos 400 μL de acetato de potássio 5M. Misturou-se a solução por inversão e incubou-se no gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a $15294 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante transferido para tubos novos, sendo acrescentado a este um volume de

clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A solução foi misturada por inversão durante 2 minutos e centrifugou-se novamente a 15294 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e, novamente tratado com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sob as mesmas condições. Posteriormente, a fase superior foi transferida para tubos novos e foram acrescentados 1000 µL de etanol absoluto gelado (6°C). Misturou-se a solução e levou-se ao freezer -20°C 'overnight'.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 15294 x g por 20 minutos, descartando-se a fase líquida com cuidado para não dispensar o resíduo de DNA. A seguir, o resíduo foi lavado com 1000 µL de etanol 70% e os tubos foram centrifugados a 15294 x g por 10 minutos. A fase líquida foi novamente descartada e o resíduo foi colocado para secar em câmara de fluxo laminar por cerca de uma hora. Posteriormente, o resíduo foi ressuspensionado em 80 µL de Tampão TE (Tris-HCl 1M pH 8,0 e EDTA 0,5M pH 8,0) por 24 horas à temperatura de 4°C. A avaliação da quantidade do DNA e da sua qualidade foi realizada com o auxílio de um biofotômetro.

A coleção de isolados foi submetida à reação PCR com *primers* desenhados e desenvolvidos por MILLS et al. (1992), para amplificação de uma banda exclusiva de cerca de 500 pb, designados Calnt2 (5'GGGGAAGCCTCTCGCGG3'), específico para *C. acutatum* e Cglnt (5'GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG3'), específico para *C. gloeosporioides*, os quais foram utilizados em conjunto com o *primer* ITS4 para amplificação da região ITS (WHITE et al., 1990).

Como padrões de amplificação foram utilizados um isolado de *C. acutatum*, proveniente de flores sintomáticas de podridão floral em citros e um isolado de *C. gloeosporioides*, proveniente de panículas sintomáticas de antracnose em mangueira, previamente identificados, mediante sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 amplificada, utilizando-se o par de *primers* ITS1/ITS4 (WHITE et al., 1990). Ambas as espécies de *Colletotrichum*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* foram seqüenciadas no Laboratório de Bioquímica de Plantas e Microorganismos, do Departamento de Tecnologia, da FCAV/UNESP, em Jaboticabal.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 200mM, pH 8,4); dNTP's (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 2,5 mM de cada) 0,2 mM, 1,5U de Taq DNA polimerase, MgCl₂ 2 mM, *primer* iniciador 5 pmol, 60 ng de DNA e água pura estéril q.s.p. 20µL. Para a amplificação com os pares de *primers* Calnt2/ITS4 e Cglnt/ITS4 as reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller - MJ Research, inc., sendo utilizados um ciclo a 95°C por 5 minutos, 36 ciclos a 94°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto para amplificação com o *primer* Calnt2/ITS4 ou a 54°C para o Cglnt/ITS4 e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e para finalizar 1 ciclo a 72°C por 10 minutos. O produto da PCR foi revelado por eletroforese em tampão TEB 1X (Tris 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2,5mM, pH 8,3), utilizando gel de agarose 1,0 %, contendo brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizadas sob luz UV em equipamento de fotodocumentação (GEL DOC 1000 – BioRad). Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador 100 pb “DNA Ladder Plus” (Fermentas).

2.2.3. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum*

Todos os 130 isolados utilizados na identificação molecular foram previamente agrupados, tomando-se como referência a procedência. Em seguida, foram avaliados quanto ao aspecto e coloração das colônias. Posteriormente, de forma aleatória, foram tomados quarenta e dois isolados (Tabela 1) para a realização de avaliações morfométricas de colônias e morfológicas de conídios e apressórios.

Para a avaliação do aspecto morfológico, discos de colônias, de 5 mm de diâmetro, foram extraídos das margens de culturas de sete dias, cultivadas em meio BDA e transferidos para novas placas contendo o mesmo meio de cultura. A seguir, tais culturas foram incubadas a 25°C±2°C, sob luz fluorescente contínua. Após dez dias de incubação, período em que ocorreu estabilização na coloração das colônias procedeu-se a avaliação da coloração das colônias, da borda e do reverso, sendo também avaliada a possível presença de setores. Para cada isolado foram utilizadas três repetições. Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri contendo os respectivos isolados.

A partir das avaliações quanto à coloração das colônias, da borda e do reverso, e quanto à possível presença de setores desenvolveu-se uma escala de notas, considerando cada caráter qualitativo avaliado.

Para a tomada do diâmetro das colônias as avaliações foram realizadas diariamente, medindo-se o seu tamanho em sentidos perpendiculares entre si, até que algum isolado, a colônia tenha atingido o bordo da placa. A partir de tais dados foi determinado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), conforme NECHET (1999), empregando-se a fórmula usada por OLIVEIRA (1991):

$$\text{IVCM} = (D - D_a) / N \text{ onde,}$$

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial.

D= diâmetro médio da colônia; D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior e, N= número de dias após a inoculação.

Para o número de conídios produzidos foram utilizadas as mesmas colônias avaliadas quanto à coloração das colônias, portanto, as avaliações foram realizadas após dez dias de cultivo em meio BDA. Para tal, quatro discos de 5 mm de diâmetro foram removidos do centro das colônias e transferidos para beakers de 100 mL contendo 20 mL de água destilada. Nesses frascos tais discos foram agitados por meio de um agitador magnético do tipo “Vortex” por 5 minutos. Posteriormente, a suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze e os conídios quantificados em hemocítmetro do tipo Neubauer.

Para a caracterização dos apressórios, inicialmente deu-se a indução da sua produção mediante a deposição de gotas de 0,25 mL da suspensão conidial a 1×10^5 conídios/mL, em folhas de laranjeira ‘Pêra’, novas, selecionadas quanto à uniformidade em tamanho, idade e integridade física. Antes, as culturas fúngicas foram mantidas em BDA, por dez dias, sob luz contínua. Em tais folhas, previamente à deposição das gotas, foram demarcados dois pontos, sobre os quais deu-se a deposição das gotas. A seguir, as folhas foram inseridas e mantidas em placas de Petri, vedadas e incubadas em ambiente de laboratório, de $25^\circ\text{C} \pm 4^\circ\text{C}$, por 48 h, no escuro. Posteriormente, depositou-se uma gota da mistura 1:1 (v/v) de esmalte incolor e acetona sobre cada ponto marcado. Após a secagem, com auxílio de uma pinça removeu-se a película

formada. Para cada isolado foram usadas duas folhas contendo dois discos em cada uma delas. No total foram avaliados quatro discos por isolado, a partir dos quais procedeu-se a avaliação do formato de 40 apressórios.

Para a análise dos resultados quanto aos valores do IVCM, diâmetro das colônias aos sete dias de cultivo e esporulação empregou-se primeiramente, o tratamento estatístico das características individuais. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com quarenta e dois isolados e três repetições por isolado. As médias foram comparadas através do teste de Scott & Knott ($P \leq 0,05$).

A seguir, na complementação da análise estatística, realizaram-se as análises exploratórias multivariadas, a análise de agrupamento por método hierárquico e a análise de componentes principais, que permitiram a avaliação em conjunto de todas as avaliações morfológicas.

A técnica de agrupamento hierárquico interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si (MOITA NETO & MOITA, 1998). Para medir a semelhança entre os centróides de cada isolado, utilizou-se a distância euclidiana (medida de dissimilaridade) para o conjunto das sete variáveis e como estratégia de agrupamento adotou-se o método de Ward. O resultado da análise foi apresentado em forma gráfica (dendrograma), auxiliando na caracterização dos grupos.

A análise de componentes principais permite condensar a maior quantidade da informação original contida em p variáveis (coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de setores, diâmetro das colônias, índice de velocidade de crescimento, número de conídios produzidos) em duas variáveis latentes ortogonais denominadas componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais criadas com os dois maiores autovalores da matriz de covariância dos dados (HAIR, 2005). Desta forma, o conjunto inicial de sete variáveis passou a ser caracterizado por duas novas variáveis latentes, o que possibilitou sua localização em figuras bidimensionais (ordenação dos isolados por componentes principais). A análise de componentes principais também pode ser usada para julgar a importância das próprias variáveis originais escolhidas, ou seja, as variáveis originais com maior peso

(loadings) na combinação linear dos primeiros componentes principais são as mais importantes do ponto vista estatístico (MOITA NETO & MOITA, 1998).

2.2.4. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* em variedades de plantas cítricas

Para caracterização patogênica dos isolados de *C. acutatum* foram realizados três ensaios. Nos dois primeiros ensaios, realizados em casa de vegetação, em 06/2007 e 10/2008, flores de plantas de laranjeiras 'Pêra', de dois anos de idade, no primeiro ano, e Valência de três anos de idade, no segundo ano, foram inoculadas com suspensão contendo 1×10^5 conídios/mL, utilizando nebulizador manual do tipo "De Vilbs", em vazão suficiente para proporcionar completa cobertura das flores. Para tal, foi empregado o isolado P3B, o qual situou-se dentre os que apresentaram uma das mais altas taxas de conídios produzidos.

A inoculação foi realizada em flores nos estádios de florescimento descritos por AGUSTI et al. (2000): (i) 'cabeça-de-alfinete', caracteriza-se pela presença de botões florais verdes, com comprimento menor que 4mm; (ii) 'cabeça-de-fósforo', predominância de botões florais verdes a verde-esbranquiçados, arredondados de 4 a 6 mm de comprimento; (iii) 'cotonete', predominam botões florais brancos, fechados, alongados ou em expansão, com comprimento superior a 6 mm, na fase de início de expansão', (iv) 'cotonete' totalmente expandido, porém sem pétalas abertas, (v) flor aberta e (vi) 'chumbinho'. As plantas controle foram pulverizadas somente com água destilada, nos mesmos estádios anteriormente mencionados.

O número de flores inoculadas em cada estágio de florescimento variou de acordo com a sua disponibilidade nas plantas. Para a variedade Pêra foram inoculadas: (i) 'cabeça-de-alfinete': 103 botões; (ii) 'cabeça-de-fósforo': 73 botões; (iii) 'cotonete' em expansão: 75 botões; (iv) 'cotonete' totalmente expandido: 30 botões; (v) flor aberta: 30 flores; (vi) 'chumbinho': 87 frutos jovens. O número de flores pulverizadas somente com água destilada (testemunha) também variou para cada estágio de florescimento: (i) 'cabeça-de-alfinete': 11 botões; (ii) 'cabeça-de-fósforo': 22 botões; (iii) 'cotonete' em

expansão: 22 botões; (iv) 'cotonete' totalmente expandido: 13 botões; (v) flor aberta: 15 flores; (vi) 'chumbinho': 17 frutos jovens. Para a variedade Valência foram inoculadas: (i) 'cabeça-de-alfinete': 60 botões; (ii) 'cabeça-de-fósforo': 52 botões; (iii) 'cotonete' em expansão: 50 botões; (iv) 'cotonete' totalmente expandido: 46 botões; (v) flor aberta: 30 flores; (vi) 'chumbinho': 80 frutos jovens. O número de flores pulverizadas somente com água destilada (testemunha), foi: (i) 'cabeça-de-alfinete': 21 botões; (ii) 'cabeça-de-fósforo': 12 botões; (iii) 'cotonete' em expansão: 25 botões; (iv) 'cotonete' totalmente expandido: 18 botões; (v) flor aberta: 20 flores; (vi) 'chumbinho': 21 frutos jovens.

Cerca de doze horas antes da inoculação as plantas foram mantidas em casa de vegetação, sob nebulização, com 100% de umidade relativa. Posteriormente à inoculação, de forma semelhante, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, sob nebulização, com 100% de umidade relativa durante sete horas. Essa condição ambiental foi também adotada nos três dias subsequentes à inoculação. Após esse período, até que ocorresse a última avaliação, as plantas permaneceram em casa de vegetação sob as mesmas condições.

O período das avaliações quanto à porcentagem de flores sintomáticas variou de acordo com o estágio em que as flores foram inoculadas. As avaliações foram realizadas diariamente após 48h da inoculação até a queda fisiológica dos frutos.

As avaliações consistiram na determinação da incidência de flores sintomáticas, assim como o seu nível de severidade, determinada mediante emprego de escala de notas que variaram de: 0 - ausência de sintomas, 1 - sintoma leve (apenas uma pétala com sintomas), 2 - sintoma moderado (de duas a três pétalas com sintomas) e 3 - sintoma severo (mais que três pétalas com sintomas). A presença de cálices retidos foi avaliada após a queda fisiológica dos frutos.

No terceiro ensaio, realizado em 04/2009, foram testados os isolados pertencentes a grupos morfológicos que, uma vez classificados quanto à coloração e aspecto da colônia, apresentaram um comportamento diferenciado (Tabela 1). Tais isolados foram inoculados em flores no estágio 'cotonete' de plantas de laranjeiras doce, 'Natal', 'Valência', 'Hamlin' e 'Folha Murcha', com três anos de idade, mantidas em vasos, sob condições de casa de vegetação, no Departamento de Fitossanidade da

UNESP, Câmpus de Jaboticabal. O número de flores inoculadas variou de acordo com cada tratamento e com a sua disponibilidade em cada planta. Entretanto, foram inoculados pelo menos vinte flores para cada uma das variedades avaliadas.

A suspensão de conídios foi preparada a partir de culturas mantidas por dez dias em meio BDA a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob luz fluorescente contínua. Usou-se suspensão contendo 1×10^5 conídios/mL, sendo que para inoculação empregou-se nebulizador manual do tipo “De Vilbs”, em vazão suficiente para proporcionar completa cobertura das flores. Os procedimentos antes e depois da inoculação foram os mesmos adotados e descritos nos dois primeiros ensaios.

A avaliação foi realizada diariamente 48h após a inoculação, onde procedeu-se a contagem de flores com sintomas típicos da doença em todas as variedades avaliadas. Os dados obtidos foram expressos em porcentagem.

2.3. Resultados

2.3.1. Identificação molecular de isolados de *Colletotrichum* spp.

No presente estudo foi verificado que os 130 isolados submetidos à identificação molecular apresentaram amplificação de uma banda específica, de cerca de 500 pb para *C. acutatum*, quando submetidos à PCR com o par de *primers* CaInt2/ITS4. Entretanto, ao serem submetidos à PCR com os *primers* CgInt/ITS4, específico para *C. gloeosporioides*, tal banda não foi amplificada (Figura 1).

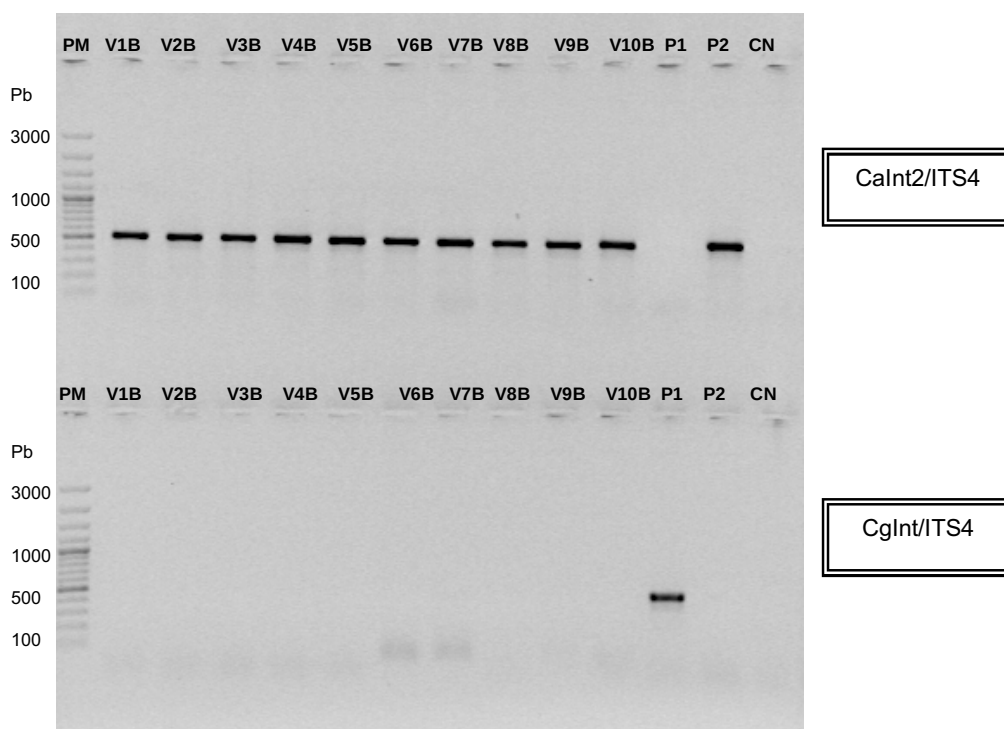


Figura 1. Eletroforese do produto de PCR com os primers específicos CaInt2/ITS4 e CgInt/ITS4 para os isolados da variedade Valência obtidos em Brotas (V1B, V2B...,V10B). PM: 100 pb “DNA Ladder Plus” (Fermentas). P1 e P2: isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*, respectivamente, classificados pela análise do sequenciamento de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2. CN: controle negativo, *mix* livre de DNA.

2.3.2. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum*

As colônias de *C. acutatum* apresentaram coloração variando de cinza a salmão/branca/acinzentada. A coloração da borda variou de branca a cinza, enquanto que o reverso de branca a salmão/negra/verde/branca. Para alguns isolados foi observada a presença de setores (Tabelas 2 e 4).

Através da análise de variância dos dados de IVCM, diâmetro das colônias após sete dias de cultivo e número de conídios produzidos, foi verificado que houve efeito significativo (Tabela 3).

Tabela 2. Escala de notas referente à coloração das colônias, do bordo e do reverso, e quanto à possível presença de setores.

Escalas	C_C	C_B	C_R	S
0	Cinza	Branca	Branca	+
1	Branca/acinzentada	Cinza	Salmão/branca	-
2	Salmão/branca		Salmão/negra	
3	Branca/acinzentada/verde		Salmão/negra/branca	
4	Salmão/branca/acinzentada		Salmão/branca/verde	
5			Salmão/negra/verde/branca	

C_C: coloração das colônias, C_B: coloração do bordo; C_R: coloração do reverso, S: presença (+) ou ausência de setores (-)

Tabela 3. Análise de variância (quadrados médios) do índice de velocidade de crescimento (IVCM), diâmetro de colônias após sete dias de cultivo (DC) e esporulação (E).

Causas de Variação	IVCM	DC	E ($\times 10^4$) ^x
Isolados	0,17**	1,08**	6,73**
Resíduo	0,068	0,44	1,20
Média Geral	1,85	5,70	3,87
CV (%)	14,08	11,66	28,36

^x: dados transformados em $\sqrt{x+1}$; **: Significativo ($P < 0,01$)

Para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), verificou-se pelo teste de Scott & Knott a formação de 2 grupos de isolados: grupo 1, N1B, N6B, V3B, FM1B, L7B, L9B, B5B, H2B, H3B, H10B, P2I, P5I, P11I, N3I, N11I, V13I, P6S, P8S, P10S, N1S, N2S, N4S, V5S, V9S e V11S, isolados com menor IVCM e grupo 2: P2B, P3B, P7B, N9B, V7B, V10B, FM7B, FM10B, L5B, LV2B, LV3B, LV6B, B2B, B7B, N7I, V4I e V9I, isolados com maior IVCM (Tabela 4).

Da mesma forma, para a variável diâmetro das colônias após sete dias de cultivo (DC), observou-se a organização dos isolados em 2 grupos pelo teste de Scott & Knott: grupo 1, N1B, N6B, L5B, L7B, L9B, B5B, H2B, H3B, H10B, P5I, P11I, V13I, P8S, N1S, N4S, V5S, V9S e V11S, isolados que apresentaram o menor diâmetro e grupo 2, P2B, P3B, P7B, N9B, V3B, V7B, V10B, FM1B, FM7B, FM10B, LV2B, LV3B, LV6B, B2B, B7B, P2I, N3I, N7I, N11I, V4I, V9I, P6S, P10S e N2S, isolados que se caracterizaram pelo maior diâmetro das colônias (Tabela 4).

Em relação ao número de conídios produzidos (E), verificou-se a formação de quatro grupos de isolados: grupo 1, N6B, V7B, LV2B, B5B, P11I, V4I, P8S, N1S e V11S, isolados com menor esporulação; grupo 2: P2B, N1B, V10B, FM7B, FM10B, L5B, L9B, LV3B, B2B, H2B, P2I, N11I, P6S e V5S; grupo 3: N9B, FM1B, L7B, LV6B, H10B, P5I, N7I, V9I, P10S, N2S, N4S e V9S e grupo 4: P3B, P7B, V3B, B7B, H3B, N3I e V13I, isolados com maior (Tabela 4).

Quanto à morfologia das estruturas reprodutivas verificou-se que, no caso dos conídios, esses se apresentaram de forma consistente com uma das extremidades arredondada e a outra de formato obtuso. No caso dos apressórios, os mesmos apresentaram formato predominantemente arredondado.

Através da análise de agrupamento pelo método hierárquico realizada com as variáveis, coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de setores, índice de velocidade de crescimento, diâmetro de colônias aos sete dias de cultivo e esporulação, verificou-se grande variabilidade entre os isolados, resultando numa arquitetura envolvendo seis grupos de isolados caracterizados como I, II, III, IV, V e VI (Figura 2).

Dos nove isolados que compuseram o grupo I, B2B, V3B, N3I, N7I, V9I, P2I, V10B, B7B e N9B, observa-se que houve uma grande variabilidade entre estes, com elevadas distâncias euclidianas, com exceção de V9I, P2I e V10B, que apresentaram maior similaridade. Neste grupo encontram-se os isolados N3I e B2B, os quais apresentaram um dos maiores índices de esporulação e elevado diâmetro de colônias e IVCM respectivamente.

O grupo II, composto por sete isolados, LV6B, LV3B, N1S, P10S, V4I, LV2B e V7B, caracterizaram-se principalmente pela ausência de setores e por apresentarem uma ou duas cores na colônia e no reverso. O isolado LV2B pertencente neste grupo caracterizou-se por apresentar um baixo número de conídios, embora estatisticamente o mesmo não tenha diferido de vários outros isolados avaliados.

Tabela 4. Médias do índice de velocidade de crescimento (IVCM), diâmetro das colônias (DC), número de conídios produzidos (E) e notas correspondentes à coloração das colônias (C_C), da borda (C_B) e do reverso (C_R), assim como quanto à ausência ou presença de setores (S).

Isolados	IVCM	DC	E (x10 ⁴) ^x	C_C	C_B	C_R	S
P2B	1,95 b	5,77 b	3,51 b	1	0	4	0
P3B	1,95 b	5,70 b	6,57 d	1	0	5	1
P7B	2,09 b	5,88 b	5,85 d	1	0	3	1
N1B	1,72 a	5,30 a	3,02 b	1	1	5	0
N6B	1,72 a	4,92 a	1,00 a	1	0	4	0
N9B	2,55 b	6,32 b	4,53 c	3	1	4	0
V3B	1,85 a	6,13 b	6,03 d	4	0	1	1
V7B	1,99 b	6,68 b	1,81 a	1	0	1	1
V10B	1,90 b	6,28 b	3,02 b	3	0	4	0
FM1B	1,81 a	5,92 b	4,17 c	1	0	4	0
FM7B	1,92 b	6,05 b	3,50 b	1	1	5	0
FM10B	1,97 b	6,52 b	2,99 b	1	0	4	0
L5B	1,91 b	5,40 a	2,96 b	1	1	5	0
L7B	1,81 a	5,03 a	5,05 c	1	0	3	1
L9B	1,63 a	4,63 a	3,31 b	1	0	5	1
LV2B	2,12 b	6,25 b	1,18 a	1	0	1	1
LV3B	2,17 b	6,47 b	3,41 b	0	1	2	1
LV6B	2,00 b	6,38 b	4,77 c	0	1	2	1
B2B	2,20 b	6,40 b	3,66 b	4	0	1	1
B5B	1,80 a	5,42 a	2,36 a	1	1	5	0
B7B	2,13 b	6,12 b	5,56 d	4	1	5	0
H2B	1,87 a	5,22 a	3,87 b	1	0	3	1
H3B	1,83 a	5,45 a	5,75 d	1	0	5	1
H10B	1,70 a	5,30 a	5,25 c	2	0	4	0
P2I	1,78 a	5,85 b	3,69 b	3	0	4	0
P5I	1,74 a	5,35 a	4,41 c	3	1	4	0
P11I	1,61 a	4,85 a	1,84 a	3	0	4	0
N3I	1,83 a	6,20 b	7,31 d	3	0	4	0
N7I	2,15 b	6,43 b	5,05 c	3	0	4	0
N11I	1,84 a	6,00 b	3,29 b	1	0	4	0
V4I	2,10 b	5,97 b	2,42 a	1	0	0	1
V9I	1,89 b	5,90 b	4,53 c	3	0	4	0
V13I	1,41 a	4,48 a	5,75 d	1	0	4	0
P6S	1,87 a	5,77 b	3,44 b	1	1	5	0
P8S	1,75 a	5,40 a	1,79 a	1	1	5	0
P10S	1,67 a	5,92 b	5,19 c	1	0	0	1
N1S	1,47 a	5,28 a	1,38 a	1	0	0	1
N2S	1,78 a	6,33 b	4,67 c	1	0	5	1
N4S	1,65 a	5,30 a	4,24 c	1	0	3	1
V5S	1,71 a	5,58 a	3,85 b	0	1	5	0
V9S	1,28 a	4,17 a	4,01 c	1	1	5	0
V11S	1,42 a	5,08 a	2,52 a	1	0	4	0

X: dados transformados em $\sqrt{x+1}$; médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo Teste Scott & Knott ($p < 0,05$).

Os isolados que se enquadraram no grupo III, L9B, H2B, N4S, L7B, N2S, P7B, H3B e P3B destacaram-se pela coloração branca/acinzentada da colônia, borda branca e ausência de setores. Os isolados, L7B, H2B, N4S e P7B apresentaram a coloração do reverso salmão/negra/branca, enquanto que, L9B, N2S, H3B e P3B caracterizaram-se por uma coloração salmão/negra/verde/branca. Em sua maioria, este grupo apresentou alta esporulação.

No grupo IV encontram-se os isolados, P8S e B5B, os quais apresentaram alto grau de similaridade, apresentando todas as características avaliadas em comum. Além destes, este grupo é formado pelos isolados V5S, P6S, FM7B e L5B que apresentaram colorações branca/acinzentada, branca e salmão/negra/verde/branca, como cor da colônia, da borda e do reverso respectivamente, e presença de setores.

O grupo V foi composto pelos isolados V9S, P5I, V13I, H10B P11I, V11S e N6B, que caracterizaram-se pela presença de setores. O isolado V9S, que apresentou baixo IVCM e menor diâmetro de colônia encontra-se neste subgrupo. Observou-se uma pequena similaridade neste grupo, com elevadas distâncias euclidianas, conforme destacado na Figura 2.

O grupo VI, formado por FM10B, N11I, FM1B e P2B, apresentou elevada similaridade, principalmente com os isolados N11I e FM1B, com distâncias euclidianas próximas de zero. Todos isolados caracterizaram-se pela presença de setores, coloração da colônia branca/acinzentada, borda da colônia de coloração branca, e reverso de cor salmão/branca/verde. As características, IVCM, diâmetro da colônia e número de conídios produzidos também mostraram-se pouco variáveis entre os isolados.

A análise de componentes principais admitiu uma única distribuição dos isolados (componente principal 1 x componente principal 2). Os dois componentes principais, quando analisados em conjunto, possibilitaram uma ordenação bidimensional dos isolados e das variáveis, permitindo a construção de um gráfico biplot (Figura 3). A quantidade da informação total das variáveis originais, retida pelos dois componentes principais foi de 56,18 % (32,30 %, primeiro componente principal e 23,88 %, segundo componente principal) (Figura 3).

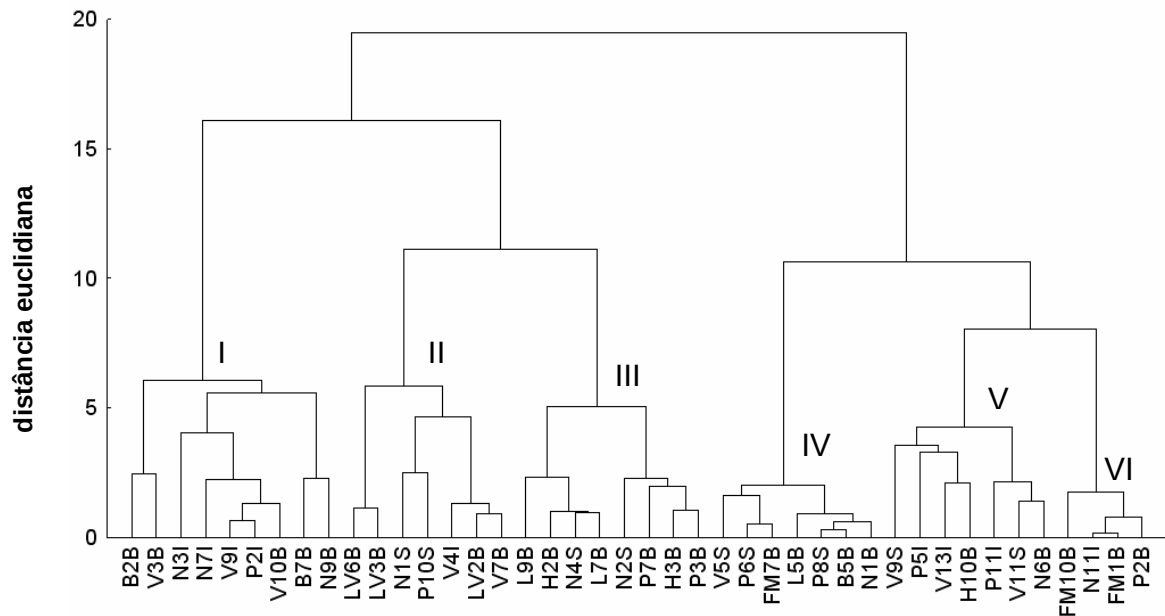


Figura 2. Dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método hierárquico mostrando a formação de grupos segundo as variáveis: coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de setores, índice de velocidade de crescimento, diâmetro de colônias após sete dias de cultivo e esporulação.

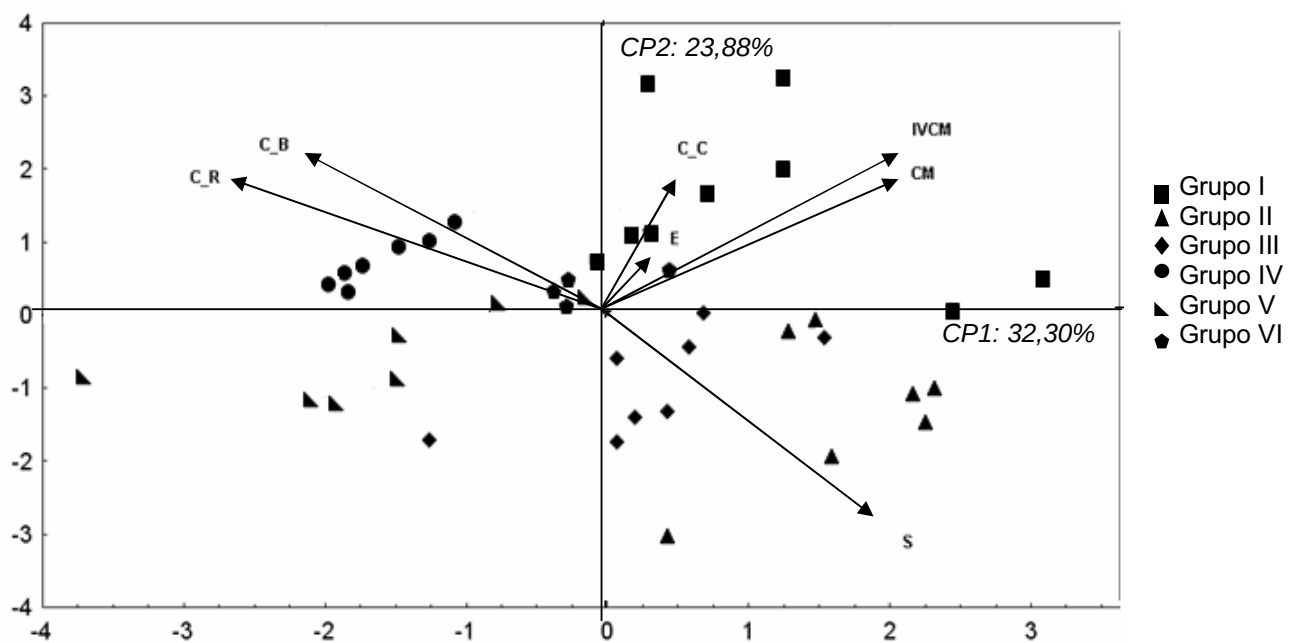


Figura 3. Distribuição dos resultados da caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum*, nos componentes principais 1 e 2.

A representação gráfica nos componentes principais (Figura 3) permitiu caracterizar as variáveis que mais discriminaram na formação dos grupos I, II, III, IV, V e VI. As variáveis, índice de velocidade de crescimento (IVCM), diâmetro de colônias aos sete dias de cultivo (DC) e esporulação (E) foram responsáveis pela discriminação do grupo I, maiores IVCM, DC e E, e grupo V, menores IVCM, DC e E. A presença de setores separou os grupos IV e VI, que apresentaram formação de setores, e II e III, onde os mesmos mostraram-se ausentes. A característica cor da colônia (C_C) auxiliou na discriminação do grupo V, que apresentou três cores, ao passo que os grupos II, III, IV e VI apresentaram uma ou duas cores. A cor da borda (C_B) contribuiu à separação dos grupos III e VI, que apresentaram cor branca, e IV, de cor cinza. A cor do reverso (C_R) discriminou os grupos V e VI, que apresentaram três ou quatro cores, e IV, com quatro cores.

2.3.3. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* em variedades de plantas cítricas

No estágio flor aberta, as avaliações foram realizadas após 48h da inoculação, enquanto que em 'cotonete', na fase de início de expansão, foi após sete dias. As avaliações foram realizadas diariamente, sendo que para os estádios 'cabeça-de-alfinete' e 'cabeça-de-fósforo', deu-se após 25 e 15 dias decorridos da inoculação, respectivamente.

Quanto aos estádios de florescimento, sintomas típicos de PFC foram observados quando da inoculação de *C. acutatum* na fase de 'cotonete' em expansão, 'cotonete' expandido e em flores abertas nas variedades, Pêra e Valência. Para os estádios de primórdios florais, com predomínio de pigmentos verdes, definidos como 'cabeça-de-alfinete' e 'cabeça-de-fósforo', foram observados sintomas leves nas flores somente quando inoculada a variedade Valência.

A maior porcentagem de flores sintomáticas deu-se quando da inoculação de *C. acutatum* nas fases de 'cotonete' expandido e de flor aberta. Sintomas da doença foram

também observados quando da inoculação no estágio de 'cotonete' em expansão (Tabela 5 e Figura 4).

A presença de cálices retidos foi constatada em todas as situações em que se procederam as inoculações, independente da fase do estágio de florescimento (Tabela 5). Surpreendentemente, a sua presença foi observada quando da inoculação de *C. acutatum* na fase de 'chumbinho', quando as respectivas pétalas de flores correspondentes já haviam caído. Entretanto, nessa fase, de forma semelhante à observada quando da inoculação na fase de 'cabeça-de-alfinete', a retenção de cálices foi baixa, quando comparada àquela observada nas inoculações realizadas nas demais fases, já que estiveram em torno de 100%.

Tabela 5. Avaliação da patogenicidade do isolado P3B de *Colletotrichum acutatum* inoculado em flores e em frutos jovens (chumbinhos) de laranjeiras 'Pêra' e 'Valência' e consequente produção de flores sintomáticas e de cálices retidos.

Tratamento/Estádios da inoculação ¹	Flores sintomáticas (%) ²				Cálices retidos (%) ²	Flores sintomáticas (%) ³				Cálices retidos (%) ³
	0*	1	2	3		0	1	2	3	
1. Cabeça-de-alfinete	100	0	0	0	34	95	5	0	0	43
2. Cabeça-de-fósforo	100	0	0	0	100	82,7	17,3	0	0	92
3. Cotonete em expansão	85,3	0	4	10,7	100	40	22	18	20	100
4. Cotonete totalmente expandido	23,3	36,6	16,8	23,3	100	8,7	23,9	37	30,4	100
5. Flor Aberta	6,8	90	3,2	0	97	3,3	53,3	36,7	6,7	93,3
6. Chumbinho	100	0	0	0	21	100	0	0	0	27

¹ Estádios de florescimento e a fase de 'chumbinho'.

² Porcentagem de flores sintomáticas e de cálices retidos em plantas de laranjeira 'Pêra' avaliadas em 2007. Número de flores inoculadas: (i) 'cabeça-de-alfinete': 103 botões; (ii) 'cabeça-de-fósforo': 73 botões; (iii) 'cotonete' em expansão: 75 botões; (iv) 'cotonete' totalmente expandido: 30 botões; (v) flor aberta: 30 flores; (vi) 'chumbinho': 87 frutos jovens.

³ Porcentagem de flores sintomáticas e de cálices retidos em plantas de laranjeira 'Valência' avaliadas em 2008. Número de flores inoculadas: (i) 'cabeça-de-alfinete': 60 botões; (ii) 'cabeça-de-fósforo': 52 botões; (iii) 'cotonete' em expansão: 50 botões; (iv) 'cotonete' totalmente expandido: 46 botões; (v) flor aberta: 30 flores; (vi) 'chumbinho': 80 frutos jovens.

* Escala de notas: 0 - ausência de sintomas, 1 - sintoma leve (apenas algumas pétalas com sintomas), 2 - sintoma moderado (cerca de 50% das flores com sintomas) e 3 - todas as pétalas com sintomas (sintoma severo).



Figura 4. Flores sintomáticas inoculadas com *Colletotrichum acutatum*, isolado P3B.

No experimento subsequente, verificou-se que todos os quinze isolados de *C. acutatum* avaliados foram patogênicos, com produção de sintomas típicos de PFC em flores de todas as variedades de laranjeiras avaliadas. As porcentagens de flores sintomáticas para cada variedade foram: 43% para 'Natal', 48% para 'Valência', 38% para 'Hamlin' e 40% para 'Folha Murcha'. Tais valores indicam, portanto, que as flores de todas as variedades testadas são suscetíveis a *C. acutatum* (Figura 5).

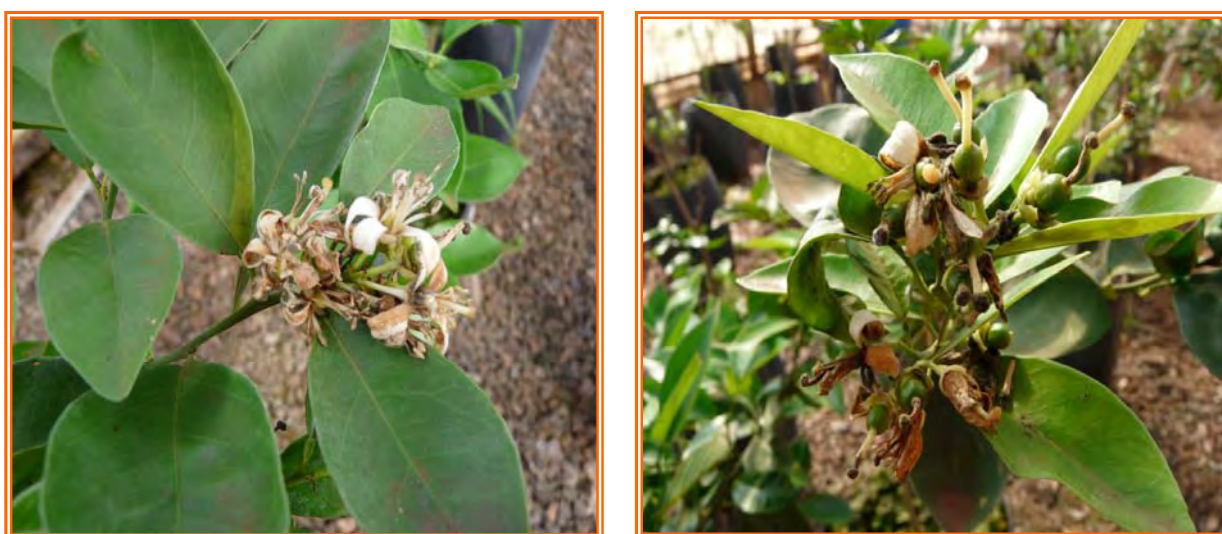


Figura 5. Vista parcial de flores sintomáticas de plantas cítricas da variedade 'Natal' inoculadas com *Colletotrichum acutatum*.

2.4. Discussão

Os estudos realizados com a utilização de *primers* taxon-específicos permitiram identificar os isolados como pertencentes à espécie *Colletotrichum acutatum*. BROWN et al. (1996), também observaram através de PCR com *primers* específicos para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* e através do sequenciamento da região ITS do rDNA que o agente causal da podridão floral do citros é *C. acutatum*. KURAMAE-IZIOKA et al. (1997) analisaram polimorfismo entre os isolados através das análises de RAPD e concluíram que a forma SGO compete à espécie *C. acutatum*.

De acordo com a literatura, condições relacionadas, principalmente, com a presença de flores, molhamento foliar e, preferencialmente, temperaturas amenas estão associadas à doença PFC (DENHAM & WALLER, 1981; AGOSTINI et al., 1992; TIMMER, 1993; TIMMER & ZITKO, 1993; AGOSTINI & TIMMER, 1994; TIMMER et al., 1994; GOES, 1995; PERES, 1998). Porém, sob condições naturais de cultivo no Brasil, principalmente em algumas regiões do Estado de São Paulo, tem-se verificado um comportamento diferenciado desse fungo. Destaca-se inclusive, que em algumas vezes, são observadas incidência e severidade da doença em níveis elevados, mesmo sem contar com condições ambientais altamente favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Todavia, em que pese o comportamento diferenciado do fungo, os resultados obtidos de caracterização molecular permitem reconhecer que tais infecções resultam exclusivamente de *C. acutatum*, sendo descartada a possibilidade do envolvimento de uma espécie adicional. Dessa forma, em vista desse comportamento atípico apresentado pelo fungo nas áreas apontadas, leva-se a admitir a existência de uma possível especiação do patógeno, ou mesmo a ocorrência de mutação. Há, no entanto, necessidade de estudos complementares, incluindo a realização de análises filogenéticas.

Mediante análises morfológicas, observou-se ampla variabilidade entre os isolados da forma SGO de *C. acutatum* com base nas características avaliadas, com exceção dos formatos de conídios, que predominaram os de extremidade arredondada e a outra obtusa, e apressórios, aos quais prevaleceu o formato arredondado,

convergindo com resultados obtidos por AGOSTINI et al. (1992) e GOES & KIMATI (1997a).

As colônias de *C. acutatum* apresentaram colorações variadas, bem como os respectivos bordos e o reverso. De acordo com SUTTON (1992), a identificação de espécies de *Colletotrichum* é baseada em características morfológicas do fungo, podendo ser usados também testes de gama de hospedeiros. Dentre os isolados estudados, alguns apresentaram a coloração das colônias semelhante a *C. acutatum* (SUTTON, 1992; ZULFIQAR et al., 1996), porém outros não se enquadraram na morfologia descrita para a espécie. Dessa forma, considerando que uma espécie fúngica é representada por populações de biótipos e tendo em vista que estes não tenham a mesma constituição genética, ou seja, encontram-se em condição heterozigótica para um dado caráter, possivelmente ocorrerá a segregação de biótipos de comportamento variável, de acordo com o ambiente de cultivo da espécie, tornando muito difícil a definição do conceito morfológico de espécie (CANNON, et al., 2000). SONODA & PELOSI (1988) e AGOSTINI et al. (1992) avaliando isolados de *C. gloeosporioides* de citros de acordo com o aspecto de colônias, verificaram duas colorações, cinza e laranja. Os autores apontaram que as colônias formadas com pigmentação laranja foram as responsáveis pela doença PFC. KURAMAE-IZIOKA et al. (1997) analisando dezesseis isolados de *Colletotrichum* spp. de citros, observaram variações morfológicas quanto a coloração de colônias em culturas monospóricas, sendo branca, laranja, cinza, cinza escuro e negra.

Quanto aos setores, no presente estudo a presença dos mesmos foi observada em vinte e cinco isolados. Mediante as análises exploratórias notou-se que, nenhuma relação foi estabelecida entre a sua presença, e também quanto às demais características morfológicas dos isolados, com indicação, portanto, que a natureza dos mesmos, além de incerta, aparentemente, não apresenta um antecedente específico.

No contexto do desenvolvimento de colônias, avaliado em termos de índice de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro de colônias (DC) de *C. acutatum*, assim como, para o número de conídios produzidos, foi verificado que houve diferença

estatisticamente significativa entre os isolados, independente das condições ambientais em que os mesmos foram avaliados.

Embora *C. acutatum* responsável pela PFC geralmente forme colônias com crescimento lento e apresente elevada esporulação (SONODA & PELOSI, 1988; AGOSTINI et al., 1992; KURAMAE-IZIOKA et al., 1997), no presente estudo foi verificado que, algumas vezes, isolados desse fungo apresentaram crescimento rápido, porém com baixa ou rara esporulação. Também foi verificado que nem todos os isolados que apresentaram menor índice de crescimento micelial proporcionaram, também, a maior esporulação, e vice-versa.

Através das análises exploratórias das variáveis morfológicas consideradas nesta pesquisa, pode-se constatar que não houve relação entre as regiões geográficas, e nem mesmo dentre as variedades os quais esses isolados provieram. Logo que, trata-se de uma única espécie, estes resultados indicam marcante polimorfismo entre populações de *C. acutatum* de diferentes localidades e de diferentes variedades, convergindo com resultados apontados por GOES & KIMATI (1997a) e PERES et al. (2008). Claro que, destaca-se a importância da realização de análises complementares quando se busca a caracterização de fungos polimórficos, como é o caso de fungos pertencentes à espécie *Colletotrichum* spp..

A caracterização patogênica neste estudo foi de extrema relevância para a complementação dos dados moleculares e morfológicos, revelando que isolados identificados e caracterizados como *C. acutatum* estavam associados à doença PFC. Além disso, verificou-se que, todos os estádios de florescimento e, inesperavelmente, a fase 'chumbinho', mostraram-se suscetíveis ao fungo, notoriamente com diferentes expressões de sintomas.

Segundo TIMMER et al. (1994), apressórios de *C. acutatum* da forma SGO germinam e produzem hifa e conídio quando na presença de umidade e extratos de pétalas. No presente estudo, os resultados de patogenicidade quando da inoculação de *C. acutatum* em frutos no estágio 'chumbinho' indica que, além da possível suscetibilidade intrínseca dos mesmos, a presença residual de carboidratos eventualmente, colaborou para a queda desses frutos recém formados e, consequente,

formação de cálices retidos já que, o fungo necessita de nutrientes para o seu desenvolvimento. Certamente o ambiente altamente favorável conferido nas fases de pré e pós-inoculação também contribuíram para expressão dos sintomas. Tal resultado, em termos práticos constitui-se em informação relevante, pois não há relatos na literatura que quando nas fases subsequentes de queda das pétalas já não há mais riscos de infecções.

O fungo *C. acutatum*, agente causal da PFC afeta praticamente todas as variedades de citros de interesse comercial. Estudos de patogenicidade com flores de laranja-doce (*Citrus sinensis*), limão 'Galego' (*C. aurantifolia*), 'lima da Pérsia' (*C. limettioides*) e tangelo 'Orlando' (*C. paradisi* Macf. X *C. reticulata* Blanco) demonstraram haver pequena variação na suscetibilidade de pétalas das plantas de tais espécies cítricas (AGOSTINI et al., 1992; BROWN et al., 1996; GOES & KIMATI, 1997b; PERES et al., 2008).

Apesar de não haver na literatura relatos sobre a existência de variedades de laranjas doces cujas flores mostrem-se resistentes a *C. acutatum*, sob condições práticas tem-se verificado que as de maturação precoce são as menos afetadas, embora não sejam isentas de infecções. Acredita-se que, nessas variedades, dado ao seu ciclo de colheita mais precoce, o florescimento ocorra de forma mais uniforme, de tal forma que, com as primeiras chuvas há um intenso florescimento e as flores escapam das infecções do fungo o qual se reproduz com elevada intensidade nas semanas subsequentes, coincidindo com o auge de florescimento das demais variedades. Assim, para o caso das demais variedades, por apresentar colheita mais tardia, o florescimento dá-se de forma menos compacta e mais tardiamente, coincidindo com os períodos prolongados de chuvas, normalmente comuns na primavera. Além disso, no caso da laranja 'Pêra', dado aos elevados fluxos de brotações e florescimento, mesmo de forma extemporânea, há a possibilidade de infecções autóctones, dada à sobrevivência do patógeno em pétalas, folhas, cálices retidos e em ramos (AGOSTINI et al., 1992; AGOSTINI & TIMMER, 1994; TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996).

2.5. Conclusões

Isolados associados à PFC pertencem à espécie *Colletotrichum acutatum*.

Há uma elevada variabilidade morfológica entre isolados da forma SGO de *C. acutatum*, indicativo de polimorfismo entre as populações.

Todos os estágios de florescimento, assim como a fase 'chumbinho' são suscetíveis a *C. acutatum*, com consequente expressão de sintomas, incluindo retenção de cálices.

Flores de plantas cítricas das variedades de laranjas doce 'Pêra', 'Natal', 'Valência', 'Hamlin' e 'Folha Murcha' são suscetíveis a *C. acutatum*.

In vitro, isolados provenientes de uma mesma variedade e mesma região geográfica podem apresentar diferentes características morfológicas, assim como isolados de diferentes variedades e regiões podem apresentar características diferentes.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DE FONTES DE INÓCULO E SOBREVIVÊNCIA DE *Colletotrichum acutatum* EM CITROS

Resumo - *Colletotrichum acutatum* em citros produz lesões de coloração laranja-amarronzada nas pétalas, a abscisão de frutos jovens e cálices permanentes, causando a doença Podridão floral dos citros. De forma considerável, são produzidos conídios de *C. acutatum* em flores. O fungo sobrevive na forma de apressórios, como infecções quiescentes na superfície de folhas, ramos e cálices retidos. Amostras de cálices procedentes de infecções florais do ano anterior, pétalas sintomáticas e folhas completamente desenvolvidas foram coletadas de forma aleatória de plantas de laranja 'Pêra' em Itapetininga/SP e Santa Cruz do Rio Pardo/SP. Em casa de vegetação, amostras de folhas foram obtidas de plantas jovens das variedades, 'Pêra', 'Natal', 'Valência', 'Folha Murcha' e 'Hamlin'. Os resultados demonstraram elevado número de colônias obtidas a partir de pétalas. Quando na ausência de flores, o número colônias produzidas de cálices retidos diminui significativamente em relação aos meses que as plantas apresentavam flores. Cálices retidos, pétalas e folhas existentes em áreas cítricas com antecedentes de PFC são órgãos sobre os quais ocorre a sobrevivência de *C. acutatum*, sendo dessa forma, fontes de inóculo primária do fungo. *Colletotrichum acutatum* sobrevive em cálices retidos e em folhas, porém, o maior número de propágulos em termos absolutos, são verificados nos cálices retidos. *Colletotrichum acutatum* sobrevive em folhas de plantas jovens.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*, podridão floral dos citros, população residual.

3.1. Introdução

As regiões tropicais e subtropicais, apesar de serem ótimas para a produção dos citros, apresentam condições climáticas favoráveis à ocorrência de doenças fúngicas. Entre estas, a Podridão floral dos citros (PFC) também conhecida como Queda prematura de frutos cítricos (QPFC), causada por *Colletotrichum acutatum*, descrita pela primeira vez em Belize por FAGAN (1979).

Os sintomas da doença PFC apresentam-se como manchas de coloração marrom ou pêssego que posteriormente podem tornar-se de tonalidade salmão-róseo em pétalas de flores. Estas pétalas afetadas permanecem firmemente aderidas ao disco basal, adquirem consistência seca e rígida e apresentam coloração rosa pardo (TIMMER et al., 1994; TIMMER & BROWN, 2000). Os frutos recém formados ficam amarelados e caem rapidamente, enquanto que, os discos basais, cálices e pedúnculos ficam mais fortemente aderidos aos ramos e recebem o nome de “estrelinhas” (FAGAN, 1984a; FEICHTENBERGER, 1991; AGOSTINI et al., 1992).

Os conídios de *C. acutatum* são produzidos em abundância nos acérvulos em flores infectadas e são dispersos pelos respingos de chuva para outras flores, durante o período de floração. A sobrevivência do fungo dá-se por meio de apressórios formados na superfície de folhas, ramos e cálices retidos (TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996).

Colletotrichum acutaum comporta-se em citros como necrotrófico durante o curto período de florescimento, no entanto, por muitos anos, o fungo pode viver biotroficamente na forma de apressórios, como infecções quiescentes em tecidos vegetais (AGOSTINI & TIMMER, 1994; ZULFIQAR et al., 1996; PERES et al., 2005).

Os objetivos deste estudo foram: (i) determinar fontes de inóculo de *C. acutatum* em órgãos vegetativos obtidos de plantas cultivadas em ambiente natural; (ii) avaliar a sobrevivência de *C. acutatum* em cálices retidos e em folhas coletados em campo, no que se refere à quantidade de inóculo (iii) avaliar a sobrevivência de *C. acutatum* em folhas de plantas jovens.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Avaliação da população residual de *Colletotrichum acutatum* em cálices retidos, pétalas e folhas de plantas cítricas sob condições de campo

Amostras de cálices procedentes de infecções florais do ano anterior, pétalas com sintomas leves (apenas uma pétala com lesão) e folhas completamente desenvolvidas foram coletadas de forma aleatória de plantas de laranja 'Pêra' de 12 anos de plantio no município de Itapetininga/SP e, com 17 anos de idade, em Santa Cruz do Rio Pardo/SP.

As amostras foram obtidas de 5 plantas. Em cada planta foram coletados 20 cálices, 20 pétalas e 10 folhas ocasionalmente. As plantas selecionadas não passaram por nenhum tratamento com fungicida. Foram realizadas quatro amostragens em cada município, nos meses de julho, agosto, novembro e dezembro de 2006, no caso de cálices e folhas, para as pétalas foram feitas somente duas amostragens, nos meses em que as plantas apresentavam florescimento, julho e agosto. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas para o Laboratório de Fitopatologia da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, onde ficaram acondicionadas em geladeira para posterior processamento.

Em relação aos cálices, esses foram obtidos separando-se os respectivos pedúnculos. Cada amostra de cálices de cada planta foi composta por 1,0g de tecido vivo e separadas casualmente, totalizando quatro amostras por planta. As amostras de cálices foram colocadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de água destilada e estéril, seguido da agitação mecânica, durante 5 minutos, em um agitador magnético do tipo "Vortex". A partir dessa suspensão foi feita diluição 10^{-1} . Da suspensão diluída, alíquotas de 0,3 mL foram pipetadas e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio semi-seletivo (SONODA & PELLOSI, 1988; GOES & KIMATI, 1998; PERES et al., 2002). O meio semi-seletivo constituiu de meio BDA (batata-dextrose-ágar) e 10 µg/mL de carbendazim. As placas

foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas e avaliadas após 48 horas quanto ao crescimento das colônias.

No caso das pétalas foi realizada a mesma metodologia descrita acima, porém, a partir da suspensão adquirida foram feitas diluições 10^{-2} .

Para o isolamento das folhas, após lavagem em água corrente e desinfestação prévia, foram obtidos fragmentos de cada amostra, os quais foram transferidos para placas de Petri contendo meio semi-seletivo e, incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e avaliadas após 72 horas quanto ao crescimento das colônias. De cada planta foram obtidas quatro amostras, cada qual representada por uma placa de Petri contendo cinco fragmentos.

A avaliação da população residual foi baseada no número de colônias produzidas de *C. acutatum* por grama de cálices e pétalas. Para as folhas, a avaliação da população residual teve o mesmo fundamento, pela contagem do número de colônias *C. acutatum* por folha.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial $4 \times 3 \times 2$, totalizando 24 tratamentos com cinco repetições. Os tratamentos corresponderam a quatro meses de coleta (julho, agosto, novembro e dezembro), três partes das plantas (cálices, pétalas e folhas) e duas regiões em que as amostras foram coletadas (Itapetininga e Santa Cruz do Rio Pardo). Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias dos fatores comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.2.2. Avaliação da população residual de *Colletotrichum acutatum* em folhas de plantas jovens de variedades de laranja doce sob condições de casa de vegetação

As amostras foram obtidas de 10 plantas das variedades, Pêra, Natal, Valência, Folha Murcha e Hamlin, aos 2 e 3 anos de idade, e, em cada planta foram coletadas 10 folhas. Foram realizadas quatro amostragens, nos períodos de julho e dezembro de 2007, e, em julho e dezembro de 2008. As plantas foram cultivadas em condições de

casa de vegetação no Departamento de Fitossanidade da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sendo regularmente irrigadas e adubadas.

A metodologia usada para o isolamento de folhas foi a mesma descrita no item anterior. Os dados obtidos foram expressos em número de colônias produzidas de *C. acutatum* por folha.

3.3. Resultados

3.3.1. Avaliação da população residual de *Colletotrichum acutatum* em cálices retidos, pétalas e folhas de plantas cítricas sob condições de campo

Os dados referentes ao número de colônias de *C. acutatum* encontrados em cálices retidos, pétalas e folhas em Itapetininga e Santa Cruz do Rio Pardo nos meses de julho, agosto, novembro e dezembro estão contidos nas Tabelas 1 e 2.

Observa-se que, houve diferença significativa entre os dois locais, somente quando avaliadas colônias produzidas a partir de cálices retidos (Tabela 1). Foi constatada diferença estatisticamente entre o número de colônias obtidas de amostras de cálices retidos, pétalas e folhas coletadas em cada local (Tabela 1) e nos diferentes meses, julho, agosto, novembro e dezembro (Tabela 2). Assim como, verificou-se diferença entre os meses que ocorreram as coletas para as amostras de cálices retidos e pétalas (Tabela 2).

O maior número de colônias foi verificado em amostras de cálices retidos (Figura 1) e pétalas, nos meses de julho e agosto, porém, em novembro e dezembro, as plantas da variedade Pêra em Itapetininga e Santa Cruz do Rio Pardo não apresentavam florescimento, razão pela qual, as pétalas não foram amostradas (Tabela 2).

Na avaliação das amostras a partir de folhas, observou-se baixo número de colônias produzidas a partir da coleta nos dois locais e nos quatro meses (Tabelas 1 e 2).

É provável que, todas as colônias formadas a partir de cálices, pétalas e folhas sejam de *C. acutatum*, pois foi usado meio de cultura semi-seletivo para o isolamento.

Tabela 1. Média do número de colônias de *Colletotrichum acutatum* produzidas a partir de diferentes órgãos de plantas da variedade Pêra coletados em Itapetininga/SP e em Santa Cruz do Rio Pardo/SP.

Locais/ Órgãos da planta	Itapetininga ^x	Santa Cruz do Rio Pardo ^x
Cálices	2,03 aB	2,42 aA
Pétalas	1,92 aA	1,90 bA
Folhas	0,99 bA	0,86 cA

^x: dados transformados em $\log x+1$. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

Tabela 2. Média do número de colônias de *Colletotrichum acutatum* produzidas a partir de diferentes órgãos de plantas da variedade 'Pêra' coletados nos meses de julho, agosto, novembro e dezembro em Itapetininga/SP e em Santa Cruz do Rio Pardo/SP.

Meses/ Órgãos da planta	Julho	Agosto	Novembro	Dezembro
Cálices	3,33 bA	3,41 aA	1,63 aB	0,52 aC
Pétalas	3,80 aA	3,82 aA	—	—
Folhas	0,82 cA	0,95 bA	1,06 bA	0,88 aA

^x: dados transformados em $\log x+1$. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

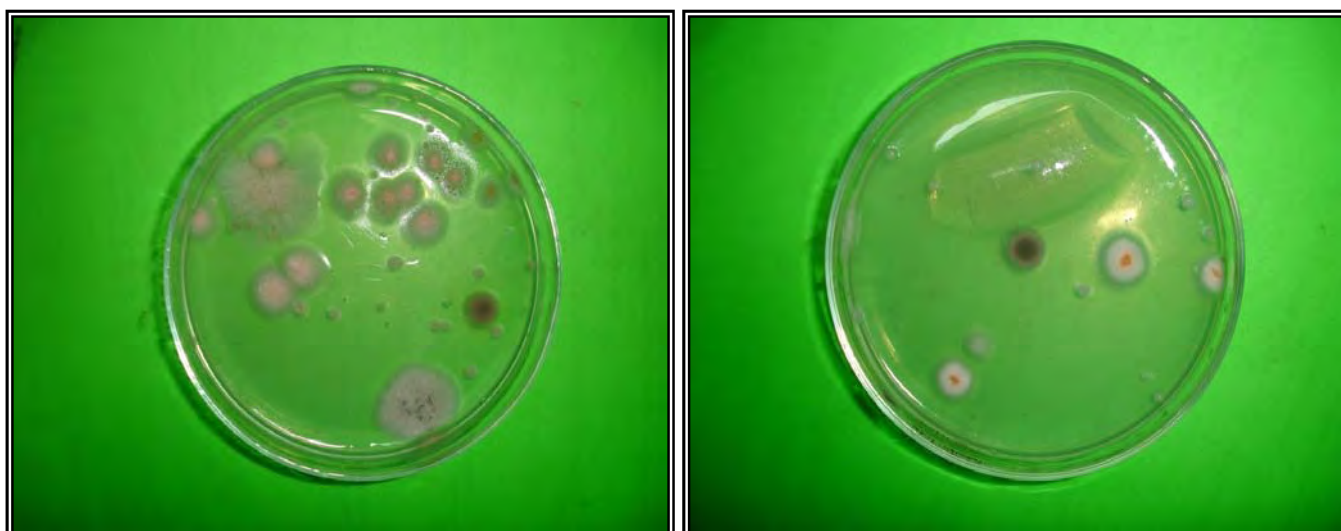


Figura 1. Colônias produzidas a partir de amostras de cálices retidos

3.3.2. Avaliação da população residual de *Colletotrichum acutatum* em folhas de plantas jovens de variedades de laranja doce sob condições de casa de vegetação

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa quanto ao número de colônias de *C. acutatum* produzidas a partir de amostras de folhas das laranjeiras 'Pêra', 'Natal', 'Valência', 'Folha Murcha' e 'Hamlin', coletadas em julho e dezembro nos anos de 2007 e 2008 (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Média do número de colônias de *Colletotrichum acutatum* produzidas a partir de folhas de plantas de diferentes variedades mantidas em casa de vegetação coletadas em 2007 e 2008.

Anos/ Variedades	2007	2008
Pêra	1,10 aA	1,22 aA
Natal	0,92 aA	0,95 aA
Valência	0,92 aA	1,10 aA
Folha Murcha	0,70 aA	0,84 aA
Hamlin	0,84 aA	0,87 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

Tabela 4. Média do número de colônias de *Colletotrichum acutatum* produzidas a partir de folhas de plantas de diferentes variedades mantidas em casa de vegetação coletadas nos meses de julho e agosto de 2007 e 2008.

Meses/ Variedades	Julho	Dezembro
Pêra	1,02 aA	1,30 aA
Natal	0,99 aA	0,89 aA
Valência	0,99 aA	1,04 aA
Folha Murcha	0,79 aA	0,75 aA
Hamlin	0,74 aA	0,97 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

A partir destas amostras colhidas de plantas mantidas em casa de vegetação foi obtido baixo número de colônias. No entanto, possivelmente, as poucas colônias

formadas eram todas pertencentes à espécie *C. acutatum*, já que utilizou-se meio semi-seletivo para o isolamento, da mesma maneira como foi feito para amostras obtidas em campo.

3.4. Discussão

Os conídios de *C. acutatum* são produzidos em abundância nos acérvulos em flores infectadas e são dispersos pelos respingos de chuva para outras flores onde penetram diretamente, sem a formação de apressório (TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996). Nesse caso, a doença PFC, manifesta-se de forma exponencial (GOES et al., 2008), sendo que, em condições de alta umidade, o fungo infecta rapidamente o tecido das pétalas. Estas informações convergem com os resultados obtidos neste estudo, os quais demonstraram elevado número de colônias obtidas a partir de pétalas.

Segundo AGOSTINI & TIMMER (1992), apressórios de *C. acutatum* aparentemente, perdem a viabilidade com o tempo, ocorrendo um declínio gradual de algumas populações com a ausência de flores. Este fato pode ser observado em cálices retidos, que quando na ausência de flores, o número de colônias obtidas através de amostras desses órgãos diminui significativamente em relação aos meses que as plantas apresentavam flores. Porém, quando avaliando folhas, esta diferença não foi observada entre os meses que as plantas proporcionavam flores.

Quanto à sobrevivência do fungo, esta ocorre por meio de apressórios formados na superfície de folhas, ramos e cálices retidos (TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996). O elevado número de colônias obtidas a partir de cálices retidos verificado nesta pesquisa reforça as evidências quanto a maior sobrevivência de *C. acutatum* nestes órgãos, porém na prática, o número de folhas encontradas nas plantas é muito maior quando comparado ao número de cálices retidos.

Conídios de *C. acutatum* conseguem sobreviver até por um mês na superfície de folhas sem germinar. Contudo, após a germinação, a maioria dos conídios produzirá apressórios que poderão permanecer viáveis nas folhas e constituir fontes de inóculo do

fungo para a infecção de flores produzidas posteriormente (TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR, et al., 1996). Em PFC, os apressórios formados em tecidos maduros são essenciais para sobrevivência de *C. acutatum* (AGOSTINI et al., 1992; AGOSTINI & TIMMER, 1994; TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996). Visto que, as flores, tecidos suscetíveis, ocorrem sazonalmente, *C. acutatum* sobrevive na forma de apressórios como infecções quiescentes em folhas maduras (AGOSTINI et al., 1992; ZULFIQAR et al., 1996).

O número de colônias produzidas a partir de folhas apresentou-se baixo, quando comparado a produção de colônias procedentes de pétalas e cálices retidos. Possivelmente, isso se deve ao fato de *C. acutatum* em folhas sobreviver na forma de apressórios como infecções quiescentes (AGOSTINI & TIMMER, 1994; ZULFIQAR et al., 1996; PERES et al., 2005), cujo número de colônias obtidas *in vitro* deve ser dependente da sua viabilidade intrínseca (AGOSTINI & TIMMER, 1992) e dos estímulos ambientais e químicos externos (TIMMER et al., 1994).

Neste estudo, verificou-se a formação de colônias de *C. acutatum* a partir de folhas de plantas jovens, as quais não haviam apresentado ainda o período de florescimento. Possivelmente, o fungo sobreviva em ramos e seja disseminado através da propagação vegetativa.

3.5. Conclusões

Cálices retidos, pétalas e folhas existentes em áreas cítricas com antecedentes de PFC são órgãos sobre os quais ocorre a sobrevivência de *C. acutatum*, sendo dessa forma, fontes de inóculo primária do fungo.

Colletotrichum acutatum sobrevive em cálices retidos e em folhas, porém, o maior número de propágulos em termos absolutos, são verificados nos cálices retidos.

Colletotrichum acutatum sobrevive em folhas de plantas jovens.

CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DE FUNGICIDAS, NO CONTROLE DA PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS, CAUSADA POR *Colletotrichum acutatum*, APLICADOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE FLORESCIMENTO

Resumo – O controle da doença Podridão floral dos citros (PFC) é feito essencialmente mediante a aplicação de fungicidas. Em pomares de laranja ‘Pêra’, localizados em Itapetininga e em Santa Cruz do Rio Pardo foram avaliados a eficiência de diferentes fungicidas aplicados isoladamente ou em combinação em diferentes estádios de florescimento visando o controle da doença. Além disso, determinou-se a viabilidade técnica da aplicação do fungicida protetor e, ou erradicante, acompanhados ou não de aplicações subsequentes com fungicidas de diferentes grupos químicos. Foram consideradas nas avaliações as variáveis, número médio de frutos efetivos (NMFE), a relação cálices retidos e frutos vingados (CR/FV), porcentagem de ramos com frutos (%RC/FRU) e produção. Observou-se que a grande dificuldade para o controle da podridão floral em citros é determinar o instante das pulverizações, para isso, várias condições devem-se ser analisadas. Os fungicidas sistêmicos, carbendazim, tiofanato-metílico e pyraclostrobin e o protetor folpet quando aplicados isoladamente em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ não diferiram entre si, portanto esses fungicidas tornam-se alternativas no controle da PFC. As aplicações de erradicante ou protetor nos estádios, primórdio floral e ‘cabeça-de-alfinete’ em combinação com fungicidas sistêmicos em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ não diferiu das aplicações dos sistêmicos isoladamente, assim nas condições em que os experimentos foram executados, as aplicações de erradicantes ou de protetor tornou-se dispensável. Não houve diferença entre três aplicações em ‘cabeça-de-alfinete’, ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ e, duas aplicações em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ de carbendazim, assim como, não houve diferença entre duas aplicações em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ e uma aplicação em ‘cotonete’ de carbendazim, logo nas situações em que os experimentos foram realizados, uma única aplicação de carbendazim no estádio de ‘cotonete’ foi suficiente para o controle da doença. A aplicação de fosfito em mistura em tanque com amônia

quaternária 2 (cloreto de n-alquil-benzil-dimetilamônio) e, em combinação com carbendazim não proporcionou melhor resultado quando comparado com os outros tratamentos, deste modo esta mistura não otimizou o controle da doença PFC.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*, queda prematura de frutos cítricos, produção

4.1. Introdução

A doença Podridão floral dos citros (PFC) ou Queda prematura dos frutos cítricos (QPFC) é causada por *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. É uma doença comum em áreas úmidas, produtoras de citros, da América tropical e subtropical (TIMMER et al., 1994).

Os sintomas da PFC distinguem-se por lesões de coloração laranja-amarronzadas, principalmente nas pétalas das flores abertas. Posteriormente à infecção de flores, os ‘chumbinhos’ caem e os cálices ficam aderidos aos ramos. Estas estruturas formadas são comumente chamadas de “estrelinhas” (FAGAN, 1984a; FEICHTENBERGER, 1991; AGOSTINI et al., 1992; TIMMER et al., 1994).

Esta doença foi inicialmente descrita em Belize, por FAGAN (1979). No Brasil, o relato da primeira ocorrência foi no Rio Grande do Sul por DORNELLES (1977), constatado PORTO et al. (1979) e, atualmente ocorre em todas as áreas produtoras de citros. No Estado de São Paulo, grandes perdas ocorreram na região sul do estado.

Praticamente todas as variedades de laranjas doces, limões e limas ácidas são suscetíveis ao patógeno, principalmente quando estas florescem mais de uma vez por ano, ou quando as condições propiciam à ocorrência de mais de uma florada (FEICHTENBERGER, 1991; TIMMER et al., 1994). Sob condições ambientais extremamente favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, a doença pode causar perdas de até 100% (TIMMER, 1993). No Estado de São Paulo, há registros de perdas significativas em muitos pomares das principais regiões produtoras paulistas, com redução de até 80% da produção (FEICHTENBERGER, 1991; FEICHTENBERGER, 1994; PRATES et al., 1995; GOES & KUPPER, 2002).

O controle da PFC é quase que exclusivamente baseado na pulverização com fungicidas na época da florada. No Brasil, fungicidas a base de carbendazim, difenoconazole, trifloxystrobin, folpet, mancozeb, ferbam, aplicados isoladamente ou em combinação, têm-se mostrado eficientes no controle da doença (GOES et al., 2000; PERES et al., 2002; GALLI et al., 2002; GOES et al., 2008).

Um programa visando a eficiência no controle da doença não é constante todos os anos, independente das combinações dos fungicidas avaliados (PORTO, 1981a; PORTO, 1981b). Portanto, alguns aspectos devem ser levados em consideração quanto à definição das estratégias de controle, com ênfase para o histórico da doença na área, as condições ambientais, o estágio de desenvolvimento da flor, a capacidade operacional, variedade e o potencial histórico de produtividade do talhão.

Os objetivos deste trabalho foram: (i) avaliar o controle da doença usando fungicidas de diferentes grupos químicos, isoladamente ou em combinação; (ii) determinar estádios de florescimento mais adequados para o controle da doença; (iii) determinar a viabilidade técnica da aplicação do fungicida protetor e, ou erradicante, acompanhados ou não de aplicações subsequentes com fungicidas de diferentes grupos químicos.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Descrições dos pomares

Os experimentos foram realizados em duas localidades, nos municípios paulistas de Itapetininga e Santa Cruz do Rio Pardo, em áreas com antecedentes comprovados por elevados níveis da PFC. No pomar de citros localizado em Itapetininga, os experimentos foram constituídos pela variedade Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), enxertada em limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), com 12 anos de plantio. Em Santa Cruz do Rio Pardo, os experimentos foram compostos pela variedade Pêra, enxertada em limoeiro 'Cravo', com 17 anos de idade. Os talhões foram selecionados considerando-se a presença de cálices persistentes remanescentes do ano anterior, indicativo do potencial da doença no ano corrente. Os dados meteorológicos de temperatura média do ar, assim como, os valores de precipitação foram obtidos da base de dados do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO, 2009),

Instituto Agrônomo (IAC), para os meses de junho a outubro de 2006 e de 2007 para os dois municípios (Tabela 1).

Tabela 1. Dados meteorológicos de temperatura média do ar (°C) e precipitação (mm) para os meses de junho a outubro de 2006 e de 2007, em Itapetininga e Santa Cruz do Rio Pardo (CIIAGRO).

Período (mês)	Itapetininga				Santa Cruz do Rio Pardo			
	Temperatura média (°C)		Precipitação (mm)		Temperatura média (°C)		Precipitação (mm)	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007
Junho	18,1	18,2	29	3,9	21,1	20,8	28,5	37
Julho	17,8	16,1	89,6	139,6	21,6	18,5	25	204,5
Agosto	17,9	19,6	16,3	3	22	22,1	20,5	1
Setembro	19,8	21,8	89,4	42,3	21,3	24,9	151	14,5
Outubro	21,8	22,5	85,1	39,9	24,9	25,4	178	195,5

4.2.2. Tratamentos (fungicidas e fertilizantes) adotados na experimentação

Os fungicidas/bactericidas empregados foram (i) cloreto de dodecil dimetil amônio, amônia quaternária 1, 1 mL/L (SporeKill[®], Defensive Comércio e Representação Ltda, Jaboticabal/SP), e (ii) cloreto de n-alquil-benzil-dimetilamônio, amônia quaternária 2, 1,5 mL/L (Fegatex[®], PRTrade Representação, Comércio, Importação e Exportação Ltda, São Paulo/SP).

Dentre os tratamentos constituídos exclusivamente por propriedades fungicidas foram avaliados: (i) chlorothalonil, 3mL/L (Daconil[®], Iharabras S.A. Indústrias Químicas, Sorocaba/SP); (ii) carbendazim, 1mL/L (Derosal[®], Bayer S.A., São Paulo/SP); (iii) tiofanato-metílico, 1,5 mL/L (Cercobin[®], Iharabras S.A. Indústrias Químicas, Sorocaba/SP); (iv) folpet, 2g/L (Folpan[®], Arysta LifeScience do Brasil Indústria Química e Agropecuária Ltda, São Paulo/SP); (v) pyraclostrobin, 0,15 mL/L (Comet[®], Basf S.A., São Paulo/SP) e; (vi) difenoconazole, 0,4 mL/L (Score[®], Syngenta Proteção de Cultivos

Ltda, São Paulo/SP). Neste contexto, foram avaliados especialmente os respectivos efeitos protetor e curativo. Também, foram realizadas combinações com produtos que, embora essencialmente de propriedade fertilizante, pudessem otimizar as respostas de controle do patógeno. Para tal foi avaliado o fosfito, 2mL/L (Nutri Phite[®], 28% de P₂O₅ e 26% de K₂O, Iharabras S.A. Indústrias Químicas, Sorocaba/SP).

4.2.3. Avaliação de fungicidas, no controle da podridão floral dos citros, causada por *Colletotrichum acutatum*, aplicados em diferentes estádios de florescimento, em Itapetininga/SP

Em Itapetininga, SP, o primeiro experimento foi implantado em junho de 2006. Foram avaliados o efeito de até quatro pulverizações com fungicidas, sendo que os produtos e a forma de aplicação, isoladamente ou em combinação, variaram de acordo com os estádios de florescimento descritos por AGUSTI et al. (2000): primórdio floral: flor fechada; 'cabeça-de-alfinete': caracteriza-se pela presença de botões florais verdes, com comprimento menor que 4mm; 'cabeça-de-fósforo': predominância de botões florais verdes a verde-esbranquiçados, arredondados de 4 a 6 mm de comprimento; 'cotonete': predominam botões florais brancos, fechados, alongados ou em expansão, com comprimento superior a 6 mm (Tabela 2). As pulverizações foram realizadas em 13/07, 24/07, 02/08 e 17/08/2006.

O mesmo experimento foi estabelecido em julho de 2007, e foram efetuadas, zero, duas e três pulverizações, conforme os estádios de florescimento: 'cabeça-de-alfinete', 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete'. As pulverizações foram realizadas em 22/08, 29/08 e 10/09/2007. Porém, no momento da primeira avaliação, observaram-se poucos cálices aderidos ao ramo, inviabilizando as análises. O mesmo ocorreu mediante a segunda avaliação, percebeu-se que não havia variação no número de frutos por planta, tornando-se mais uma vez as análises inviáveis. Portanto, os resultados deste ensaio foram descartados.

Os produtos foram aplicados mediante uso de turboatomizadores, marca Jacto[®], modelo Arbus Export, com capacidade de 2000 litros. A pressão de trabalho foi de 130 lbs/pol². A vazão empregada foi de 1050 litros por hectare ou três litros por planta.

4.2.4. Avaliação de fungicidas, no controle da podridão floral dos citros, causada por *Colletotrichum acutatum*, aplicados em diferentes estádios de florescimento, em Santa Cruz do Rio Pardo/SP

Em Santa Cruz do Rio Pardo, SP, o primeiro experimento foi implantado em agosto de 2006 e foram efetuadas de zero a três pulverizações nos estádios de florescimento designados: (i) primórdio floral; (ii) 'cabeça-de-fósforo' e (iii) 'cotonete' (Tabela 3). As pulverizações foram realizadas em 22/09, 29/09 e em 05/10/2006.

O segundo experimento foi efetivamente implantado em julho de 2007, cujas pulverizações foram realizadas em 17/08, 27/08 e 09/09/2007. Os estádios de florescimento aos quais foram realizadas as pulverizações foram 'cabeça-de-alfinete', 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete', sendo realizadas zero, duas e três pulverizações (Tabela 4).

Para aplicação dos fungicidas foi utilizado turboatomizador Martignani[®], com capacidade de 2000 litros. A pressão de trabalho foi de 1,75 bar ou 25,4 psi. O volume aplicado foi de 1200 litros de calda por hectare, ou 3,85 litros por planta.

4.2.5. Critérios de avaliação e análises estatísticas

Para determinação da eficiência dos tratamentos foram realizadas duas avaliações. A primeira, 60 dias após a queda das pétalas:

Número médio de frutos efetivos (NMFE) % = $(A/A+B) \times 100$ onde,

A = número de frutos vingados; B = número de cálices retidos e/ou número de frutos amarelecidos devido à doença.

Relação cálices retidos e frutos vingados (CR/FV) = C/D onde,

C = número de cálices retidos e/ou número de frutos amarelecidos devido à doença;

D = número de frutos vingados.

Ramos com frutos (RF) %: = (E/20)X100 onde,

E = número de ramos com frutos em 20 ramos avaliados.

A segunda avaliação foi realizada por ocasião da colheita dos frutos, quando, então, deu-se a contagem do número médio de frutos por planta.

Para todos os experimentos foi adotado o delineamento estatístico de blocos ao acaso.

Nos experimentos realizados em Itapetininga, foram empregadas três linhas de plantas, contendo no mínimo 37 plantas de extensão, sendo avaliadas as plantas existentes na linha central, a partir da 5ª planta, seguido de múltiplo de 3. Para as avaliações de número médio de frutos efetivos, cálices retidos/frutos vingados e porcentagem de ramos com frutos foram utilizadas 5 repetições, sendo que cada unidade amostral foi representada por duas plantas. Para cada uma das dez plantas amostradas foram avaliados 20 ramos, sendo cinco por quadrante. Para avaliação de produção foram contados o número médio de frutos por planta, nas cinco plantas centrais da parcela.

Para o primeiro ensaio executado em Santa Cruz do Rio Pardo, foram empregadas três linhas de plantas, de no mínimo 25 plantas, sendo avaliadas as plantas da linha central. Para tal a avaliação iniciou-se na 3ª planta de uma das extremidades, e, posteriormente, nas de múltiplo de 2, até completar a 10ª planta. Nessas avaliações foram determinados (i) número médio de frutos efetivos, (ii) cálices retidos/frutos vingados e (iii) ramos com frutos. Para todas as dez plantas foram avaliados 12 ramos, sendo três por quadrante. Para avaliação de produção, foi contado o número médio de frutos por planta nas dez plantas centrais previamente avaliadas.

Tabela 2. Tratamentos com fungicidas isoladamente ou em combinação aplicados em diferentes estádios de florescimento de laranjeira 'Pêra', visando o controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da Podridão floral dos citros. Itapetininga/SP, 2006.

Tratamentos	Estádios de Florescimento			
	Primórdio floral	Cabeça-de-alfinete	Cabeça-de-fósforo	Cotonete
T01	Amônia Quaternária 1			
T02	Amônia Quaternária 1	Amônia Quaternária 1		
T03	Chlorothalonil			
T04	Chlorothalonil	Chlorothalonil		
T05	Amônia Quaternária 2			
T06	Amônia Quaternária 2	Amônia Quaternária 2		
T07		TESTEMUNHA		
T08			Carbendazim	Carbendazim
T09			Tiofanato-metílico	Tiofanato-metílico
T10			Folpet	Folpet
T11			Pyraclostrobin	Pyraclostrobin
T12	Amônia Quaternária 1		Carbendazim	Carbendazim
T13	Amônia Quaternária 1	Amônia Quaternária 1	Carbendazim	Carbendazim
T14	Chlorothalonil		Carbendazim	Carbendazim
T15	Chlorothalonil	Chlorothalonil	Carbendazim	Carbendazim
T16	Amônia Quaternária 2		Carbendazim	Carbendazim
T17	Amônia Quaternária 2	Amônia Quaternária 2	Carbendazim	Carbendazim
T18	Amônia Quaternária 1		Tiofanato-metílico	Tiofanato-metílico
T19	Amônia Quaternária 1	Amônia Quaternária 1	Tiofanato-metílico	Tiofanato-metílico
T20	Chlorothalonil		Tiofanato-metílico	Tiofanato-metílico
T21	Chlorothalonil	Chlorothalonil	Tiofanato-metílico	Tiofanato-metílico
T22	Amônia Quaternária 2		Tiofanato-metílico	Tiofanato-metílico
T23	Amônia Quaternária 2	Amônia Quaternária 2	Tiofanato-metílico	Tiofanato-metílico
T24	Amônia Quaternária 1		Folpet	Folpet
T25	Amônia Quaternária 1	Amônia Quaternária 1	Folpet	Folpet
T26	Chlorothalonil		Folpet	Folpet
T27	Chlorothalonil	Chlorothalonil	Folpet	Folpet
T28	Amônia Quaternária 2		Folpet	Folpet
T29	Amônia Quaternária 2	Amônia Quaternária 2	Folpet	Folpet
T30	Amônia Quaternária 1		Pyraclostrobin	Pyraclostrobin
T31	Amônia Quaternária 1	Amônia Quaternária 1	Pyraclostrobin	Pyraclostrobin
T32	Chlorothalonil		Pyraclostrobin	Pyraclostrobin
T33	Chlorothalonil	Chlorothalonil	Pyraclostrobin	Pyraclostrobin
T34	Amônia Quaternária 2		Pyraclostrobin	Pyraclostrobin
T35	Amônia Quaternária 2	Amônia Quaternária 2	Pyraclostrobin	Pyraclostrobin
T36	Amônia Quaternária 2+ Fosfito	Amônia Quaternária 2+ Fosfito	Carbendazim	Carbendazim

Amônia Quaternária 1: Sporekill®, 1mL/L; Chlorothalonil: Daconil®, 3mL/L; Amônia Quaternária 2: Fegatex®, 1,5mL/L; Carbendazim: Derosal®, 1mL/L; Tiofanato-metílico: Cercobin®, 1,5 mL/L; Folpet: Folpan®, 2g/L; Pyraclostrobin: Comet®, 0,15 mL/L; Fosfito: Nutri Phite®, 2mL/L.

Tabela 3. Tratamentos com fungicidas isoladamente ou em combinação aplicados em diferentes estádios de florescimento de laranjeira 'Pêra', visando o controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da Podridão floral dos citros. Santa Cruz do Rio Pardo/SP, 2006.

Tratamentos	Gema	Cabeça-de-fósforo	Cotonete
T01	Amônia Quaternária 1		
T02	Amônia Quaternária 1	Carbendazim	Carbendazim
T03		Carbendazim	Carbendazim
T04	Amônia Quaternária 1	Amônia Quaternária 1+ Carbendazim	Amônia Quaternária 1+ Carbendazim
T05			Carbendazim
T06		Amônia Quaternária 1+ Carbendazim	Amônia Quaternária 1+ Carbendazim
T07	Chlorothalonil		
T08	Chlorothalonil	Carbendazim	Carbendazim
T09	Chlorothalonil	Chlorothalonil + Carbendazim	Chlorothalonil + Carbendazim
T10		Chlorothalonil + Carbendazim	Chlorothalonil + Carbendazim
T11		TESTEMUNHA	

Amônia Quaternária 1: Sporekill[®], 1mL/L; Chlorothalonil: Daconil[®], 3mL/L; Carbendazim: Derosal[®], 1mL/L.

Tabela 4. Tratamentos com fungicidas isoladamente ou em combinação aplicados em diferentes estádios de florescimento de laranjeira 'Pêra', visando o controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da Podridão floral dos citros. Santa Cruz do Rio Pardo/SP, 2007.

Tratamentos	Alfinete	Cabeça-de-fósforo	Cotonete
T01	Amônia Quaternária 2	Amônia Quaternária 2	Amônia Quaternária 2
T02	Amônia Quaternária 1	Amônia Quaternária 1	Amônia Quaternária 1
T03	Chlorothalonil	Chlorothalonil	Chlorothalonil
T04	Amônia Quaternária 2	Carbendazim	Carbendazim
T05	Amônia Quaternária 1	Carbendazim	Carbendazim
T06	Chlorothalonil	Carbendazim	Carbendazim
T07	-	Carbendazim	Carbendazim
T08	Tiofanato-metílico	Tiofanato-metílico	Tiofanato-metílico
T09	Carbendazim	Carbendazim	Carbendazim
T10	Difenoconazole	Carbendazim	Carbendazim
T11		TESTEMUNHA	

Amônia Quaternária 2: Fegatex[®], 1,5mL/L; Amônia Quaternária 1: Sporekill[®], 1mL/L; Chlorothalonil: Daconil[®], 3mL/L; Carbendazim: Derosal[®], 1mL/L; Tiofanato-metílico: Cercobin[®], 1,5 mL/L; Difenoconazole: Score[®], 0,4 mL/L.

No segundo experimento realizado em Santa Cruz do Rio Pardo, as pulverizações foram igualmente realizadas em três linhas de no mínimo 45 plantas,

cuja avaliação foram realizadas naquelas pertencentes à central. A avaliação foi realizada a partir da 3ª planta de uma das extremidades, seguido de múltiplo de 3. Para as avaliações de (i) número médio de frutos efetivos, (ii) cálices retidos/frutos vingados e (iii) porcentagem de ramos com frutos foram utilizadas quatro repetições. Cada repetição foi representada por três plantas. Em todas as 12 plantas amostradas foram avaliados 25 ramos, nos quatro quadrantes da planta. Para avaliação da produção foram contados o número médio de frutos por planta, nas quatro plantas centrais da parcela.

4.3. Resultados

4.3.1. Avaliação de fungicidas, no controle da podridão floral dos citros, causada por *Colletotrichum acutatum*, aplicados em diferentes estádios de florescimento, em Itapetininga/SP, 2006

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas nas variáveis, número médio de frutos efetivos (NMFE), cálices retidos/frutos vingados (CR/FV), porcentagem de ramos com frutos (%RC/FRU) e produção (PROD) (Tabela 5).

Embora a quantidade de doença não tenha sido suficientemente elevada para mostrar nitidamente a eficiência dos tratamentos, pode-se notar o efeito de alguns fungicidas aplicados isoladamente ou em combinações, bem como a época de aplicação de acordo com o estágio de florescimento.

Em relação ao NMFE (Tabela 5), verificou-se que os tratamentos 17, 18 e 20, diferiram estatisticamente dos tratamentos 12 e 29. Os resultados desta avaliação mostraram baixa eficiência da amônia quaternária 2, aplicada em primórdio floral e 'cabeça-de-alfinete' em combinação com folpet aplicado em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' (T29), bem como da amônia quaternária 1, aplicada em primórdio floral em combinação com carbendazim aplicado em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' (T12). Resultados superiores foram verificados quando na aplicação de amônia quaternária 1

em combinação com tiofanato-metílico (T18 e T20) e na aplicação de amônia quaternária 2 em combinação com carbendazim (T17). Os outros tratamentos não diferiram estatisticamente entre si.

Os fungicidas sistêmicos, carbendazim, tiofanato-metílico e pyraclostrobin, assim como o protetor folpet, em aplicações isoladas em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete', apresentaram bons resultados, indicando alternativas nas pulverizações visando o controle da PFC (Tabela 5).

Quanto à relação cálices retidos e frutos vingados (CR/FV), verificou-se que os tratamentos que se mostraram mais eficientes em relação ao NMFE, 17, 18 e 20, também se destacaram nesta avaliação. O mesmo ocorreu com os tratamentos 12 e 29, com resultados inferiores (Tabela 5).

Em relação à porcentagem de ramos com frutos (%RC/FRU), verificou-se que os tratamentos 8, 9 e 16, aplicação de carbendazim isolado em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete', aplicação de tiofanato-metílico isolado em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' e aplicação de amônia quaternária 2 em combinação com carbendazim, respectivamente, diferiram do tratamento 29, aplicação de amônia quaternária 2 em combinação com folpet (Tabela 5).

Quanto à produção (Tabela 5), alguns resultados diferiram quando comparados com os resultados das primeiras avaliações. O tratamento 27, aplicação de chlorothalonil em 'primórdio floral' e 'cabeça-de-alfinete' e folpet em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' diferiu estatisticamente dos tratamentos 3, uma única aplicação de chlorotalonil em primórdio, 12, aplicação de amônia quaternária 1 em combinação com carbendazim e 19, aplicação de amônia quaternária 1 em combinação com tiofanato-metílico. E o tratamento 12, que apresentou o menor número de frutos produzidos, também diferiu estatisticamente dos tratamentos 6, 15, 20, 25, 29 e 33.

Neste ensaio pode-se verificar que o tratamento 7, a testemunha não diferiu de outros tratamentos e apresentou uma produção relativamente alta indicando que, possivelmente, os fatores ambientais foram desfavoráveis para um alto nível da doença (Tabelas 1 e 5).

Tabela 5. Médias do efeito de fungicidas, no número médio de frutos efetivos (NMFE), na relação cálices retidos e frutos vingados (CR/FV), na porcentagem de ramos com frutos (%RF) e na produção (PROD) avaliados em laranja 'Pêra', afetada pela 'podridão floral dos citros (PFC)', em Itapetininga/SP, 2006.

Tratamentos	NMFE ^x	CR/FV ^x	%RF	PROD
T01	5,73 ab	1,80 ab	75 ab	1329 abc
T02	6,39 ab	1,61 ab	80 ab	1207 abc
T03	6,15 ab	1,67 ab	83 ab	1196 bc
T04	7,00 ab	1,45 ab	93 ab	1497 abc
T05	6,19 ab	1,72 ab	84 ab	1329 abc
T06	6,72 ab	1,57 ab	87 ab	1743 ab
T07	6,39 ab	1,60 ab	89 ab	1390 abc
T08	6,71 ab	1,52 ab	98 a	1551 abc
T09	6,73 ab	1,52 ab	98 a	1392 abc
T10	6,67 ab	1,53 ab	97 ab	1420 abc
T11	7,19 ab	1,43 ab	88 ab	1272 abc
T12	5,34 b	1,96 a	79 ab	993 c
T13	7,25 ab	1,43 ab	86 ab	1496 abc
T14	6,43 ab	1,58 ab	94 ab	1293 abc
T15	6,79 ab	1,51 ab	94 ab	1683 ab
T16	6,40 ab	1,59 ab	99 a	1432 abc
T17	7,80 a	1,30 b	89 ab	1479 abc
T18	7,81 a	1,31 b	88 ab	1484 abc
T19	6,51 ab	1,60 ab	76 ab	1196 bc
T20	7,78 a	1,31 b	96 ab	1618 ab
T21	7,34 ab	1,40 ab	87 ab	1554 abc
T22	6,87 ab	1,49 ab	97 ab	1443 abc
T23	6,89 ab	1,50 ab	86 ab	1306 abc
T24	6,32 ab	1,63 ab	80 ab	1324 abc
T25	6,70 ab	1,55 ab	85 ab	1596 ab
T26	6,26 ab	1,62 ab	90 ab	1456 abc
T27	6,75 ab	1,51 ab	93 ab	1802 a
T28	5,80 ab	1,76 ab	85 ab	1262 abc
T29	5,31 b	2,01 a	73 b	1611 ab
T30	6,52 ab	1,57 ab	88 ab	1460 abc
T31	5,91 ab	1,85 ab	77 ab	1342 abc
T32	5,97 ab	1,73 ab	88 ab	1538 abc
T33	6,72 ab	1,51 ab	95 ab	1671 ab
T34	7,45 ab	1,40 ab	97 ab	1578 abc
T35	7,15 ab	1,42 ab	93 ab	1555 abc
T36	6,45 ab	1,60 ab	89 ab	1551 abc

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

De uma forma geral, analisando todas as avaliações, verificou-se que, as amônias quaternárias 1 e 2 e o protetor chlorothalonil quando aplicados isoladamente em primórdio floral e 'cabeça-de-alfinete', tratamentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, não diferiram dos outros tratamentos. Os fungicidas sistêmicos, carbendazim, tiofanato-metílico e pyraclostrobin, quando aplicados isoladamente em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' (T8,

T9 e T11) não diferiram dos outros tratamentos, bem como a aplicação de folpet isoladamente (T10). A aplicação de fosfito em mistura em tanque com amônia quaternária e em combinação com carbendazim não diferiu dos outros tratamentos. O tratamento 12, uma aplicação de amônia quaternária 1 em combinação com 2 aplicações de carbendazim mostrou baixa eficiência no controle, quando analisadas todas as avaliações. Resultados quanto à aplicação do protetor folpet em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' em combinação com a amônia quaternária 2, variaram conforme a avaliação.

4.3.2. Avaliação de fungicidas, no controle da podridão floral dos citros, causada por *Colletotrichum acutatum*, aplicados em diferentes estádios de florescimento, em Santa Cruz do Rio Pardo/SP, 2006

De acordo com a análise de variância, verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 6).

Observou-se que na avaliação referente ao número médio de frutos efetivos (NMFE), o tratamento 1, aplicação isolada de amônia quaternária 1, o tratamento 2, aplicação de amônia quaternária 1 em combinação com carbendazim, o tratamento 7, aplicação isolada de chlorothalonil, e o tratamento 11, testemunha, não diferiram entre si, porém, diferiram dos outros tratamentos, apresentando resultados inferiores (Tabela 6).

De acordo com a avaliação da relação cálices retidos e frutos vingados (CR/FV), verificou-se que o tratamento 11, testemunha, não diferiu somente dos tratamentos 1 e 2. Os tratamentos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 não diferiram entre si (Tabela 6).

Em relação à percentagem de ramos com frutos (%RC/FRU), observou-se o mesmo que na avaliação anterior. O tratamento 7, que mostrou-se inferior na avaliação do NMFE, não diferiu dos outros tratamentos, com exceção do tratamento 4, aplicação de amônia quaternária 1 em primórdio floral em combinação com 2 aplicações de amônia quaternária 1 em mistura em tanque com carbendazim e, do tratamento 8, aplicação de chlorothalonil em combinação com carbendazim (Tabela 6).

Quanto à produção (PROD), o tratamento 11, a testemunha, só não diferiu do tratamento 1, aplicação isolada de amônia quaterária 1.

Neste ensaio, analisando de uma forma geral, observou-se que a testemunha não diferiu do tratamento 1, em todas as avaliações. Aplicações de carbendazim em mistura em tanque com chlorothalonil (T9 e T10) não apresentaram diferenças quando comparadas com aplicações de carbendazim sem a mistura (T8), já a mistura de carbendazim com amônia quaternária 1, foi mais eficiente no controle da doença em relação à aplicação de carbendazim sem a mistura. Não houve diferença estatística nas aplicações de carbendazim nas fases 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' com a aplicação isolada do fungicida no estádio de 'cotonete', em todas as avaliações (Tabela 6).

Tabela 6. Médias do efeito de fungicidas, no número médio de frutos efetivos (NMFE), na relação cálices retidos e frutos vingados (CR/FV), na porcentagem de ramos com frutos (%RF) e na produção (PROD) avaliados em laranja 'Pêra', afetada pela 'podridão floral dos citros (PFC)', em Santa Cruz do Rio Pardo/SP, 2006.

Tratamentos	NMFE ^x	CR/FV ^x	%RF ^x	PROD
T01	1,22 c	11,00 a	6,29 e	364 de
T02	2,20 c	7,60 bc	19,66 de	723 ab
T03	4,45 ab	3,11 d	32,65 cd	497 bcd
T04	5,38 a	2,71 d	59,20 ab	422 cd
T05	4,45 ab	3,13 d	51,29 abc	529 abcd
T06	5,45 a	2,16 d	41,72 bc	684 abc
T07	2,61 bc	4,49 cd	33,42 cd	587 abcd
T08	5,88 a	1,81 d	65,47 a	741 ab
T09	6,22 a	1,68 d	51,86 abc	822 a
T10	5,80 a	1,97 d	34,66 cd	818 a
T11	1,08 c	10,40 ab	3,29 e	70 e

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

4.3.3. Avaliação de fungicidas, no controle da podridão floral dos citros, causada por *Colletotrichum acutatum*, aplicados em diferentes estádios de florescimento, em Santa Cruz do Rio Pardo/SP, 2007

Os dados referentes às avaliações do número médio de frutos efetivos (NMFE), a relação cálices retidos e frutos vingados (CR/FV), percentagem de ramos com frutos (%RC/FRU) e produção (PROD) encontram-se na Tabela 7.

Com relação ao NMFE, a testemunha (T11), não diferiu do tratamento 2, três aplicações de amônia quaternária 1, do tratamento 3, três aplicações de chlorothalonil, do tratamento 4, uma aplicação de amônia quaternária 2, em combinação com duas aplicações de carbendazim e tratamento 10, uma aplicação de difenoconazole em 'cabeça-de-alfinete' em combinação com duas aplicações de carbendazim, em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete'. Os tratamentos 1, 5 6, 7, 8 e 9 diferiram da testemunha (Tabela 7). O mesmo pode ser observado nas avaliações, relação cálices retidos e frutos vingados (CR/FV) e porcentagem de ramos com frutos (%RC/FRU), com exceção do tratamento 4, que na relação cálices retidos e frutos vingados, diferiu da testemunha (T11) (Tabela 7).

Quanto à produção (Tabela 7), não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

Analisando em conjunto os resultados das avaliações, número médio de frutos efetivos, relação cálices retidos e frutos vingados e percentagem de ramos com frutos, observou-se que a aplicação de carbendazim nos estágios 'cabeça-de-alfinete', 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' (T9) e o tratamento 7, composto por aplicações de carbendazim nos estádios 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' não diferiram entre si. O tratamento 1, aplicação de amônia quaternária 2 nas 3 fases de florescimento, não diferiu dos tratamentos que apresentaram melhor (Tabela 7).

O tratamento padrão representado por difenoconazole, carbendazim e carbendazim aplicados em cabeça-de-alfinete', 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' (T10), foi estatisticamente semelhante aos melhores tratamentos e a testemunha, com exceção da avaliação de CR/FV, o qual diferiu da testemunha (Tabela 7).

Tabela 7. Médias do efeito de fungicidas, no número médio de frutos efetivos (NMFE), na relação cálices retidos e frutos vingados (CR/FV), na porcentagem de ramos com frutos (%RF) e na produção (PROD) avaliados em laranja ‘Pêra’, afetada pela ‘podridão floral dos citros (PFC)’, em Santa Cruz do Rio Pardo/SP, 2007.

Tratamentos	NMFE ^x	CR/FV ^x	%RF ^x	PROD
T01	3,93 a	2,65 b	52,12 a	727 a
T02	2,93 ab	5,81 ab	32,29 ab	830 a
T03	2,70 ab	6,51 ab	30,45 ab	712 a
T04	3,30 ab	3,40 b	39,10 ab	645 a
T05	3,86 a	2,70 b	40,80 ab	575 a
T06	4,07 a	2,77 b	47,93 a	786 a
T07	4,15 a	2,62 b	49,33 a	593 a
T08	4,14 a	2,86 b	47,98 a	856 a
T09	4,19 a	2,76 b	48,17 a	947 a
T10	3,14 ab	3,70 b	36,99 ab	598 a
T11	1,00 b	10,57 a	8,21 b	513 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

4.4. Discussão

Os testes com fungicidas e épocas de aplicação, analisados nos experimentos em Itapetininga e Santa Cruz do Rio Pardo, mostraram claramente que, para justificar uma pulverização, devem-se contemplar vários fatores. Períodos prolongados de chuvas, orvalho e neblina, ocasionando um espaçado período de molhamento foliar, favorecem o desenvolvimento de epidemias (DENHAM & WALLER, 1981; TIMMER & ZITKO, 1993; TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996).

Além disso, dentre os fatores primários que determinam o potencial para a ocorrência da doença estão, a disponibilidade de inóculo, considerando o histórico da doença nos anos anteriores, a presença de árvores doentes, que geralmente florescem fora de época e podem aumentar as chances de incidência da doença, o número de “estrelinhas” remanescentes do ano anterior e a presença de flores com sintomas antes da ocorrência da florada principal.

Entre estes importantes fatores, deve-se considerar também intensidade da florada. Segundo TIMMER et al. (1994), as condições que propiciam a ocorrência de mais de uma florada, ou variedades que florescem mais de uma vez por ano, favorecem a ocorrência da doença. Portanto, em áreas tropicais, o florescimento pode ocorrer 2 ou 3 vezes por ano, e pode variar tanto de talhão para talhão, como entre árvores dentro de um mesmo talhão.

Do mesmo modo, nos ensaios realizados, pode-se observar que outra consideração importante quanto à necessidade de pulverização, é o estágio de desenvolvimento da florada. Notou-se que, apesar da aplicação de fungicidas erradicantes e protetores em primórdio floral e ‘cabeça-de-alfinete’ com aplicações posteriores de sistêmicos mostrarem algumas vezes, um bom resultado, estes tratamentos muitas vezes não diferiram dos tratamentos realizados com aplicação isoladamente de sistêmicos em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’. Assim sendo, as aplicações de fungicidas erradicantes ou protetores em botões florais totalmente verdes muitas vezes são economicamente injustificáveis, elevando a relação custo e benefício. No entanto, considerando o histórico de produtividade da área, os fatores já mencionados, a baixa temperatura estendendo o período da florada e o preço da fruta, a aplicação destes fungicidas visando à erradicação ou proteção das flores, torna-se necessária. Por isso que, a eficiência de um programa de controle da doença não é constante todos os anos, independente das combinações dos fungicidas avaliados (PORTO, 1981a; PORTO, 1981b), sendo necessário um planejamento antes da florada principal, tendo em vista todos os conceitos especificados.

GOES et al. (2008) avaliando fungicidas aplicados em diferentes estágios de florescimento concluíram que, é essencial que o controle da doença seja feito antes de flores abertas. Segundo PERES et al. (2002), o controle da PFC com benomyl foi eficiente quando aplicado até 48 horas depois da inoculação. Para crescer, o patógeno necessita além de condições ambientais favoráveis, uma fonte exógena de nutrientes. Sob condições de infecção natural, esta fonte exógena de nutrientes fica disponível quando acontece a abertura das primeiras flores e, a água da chuva, orvalho, neblina

ou irrigação, permite a redistribuição desses nutrientes para outras partes da planta, especialmente a partir da parte superior às partes mais baixas (TIMMER et al., 1994).

Observou-se algumas vezes, uma variação nos resultados das avaliações. Este fator pode ser atribuído às condições ambientais, caracterizada por períodos mais longos de molhamento foliar favorecendo ao patógeno e limitando a eficiência dos produtos. A longevidade dos fungicidas pode ser reduzida especialmente por causa da diluição e, ou lixiviação (GOES et al., 2008).

Três aplicações de carbendazim em ‘cabeça-de-alfinete’, ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ não diferiu quando este fungicida foi aplicado em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’, assim como uma única aplicação de carbendazim em ‘cotonete’ não diferiu quando aplicado em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’. Não ocorreu uma variação, possivelmente, porque as condições não foram favoráveis ao desenvolvimento da doença ou porque como citado anteriormente, o molhamento foliar limitou a eficiência do produto. GOES et al. (2008) verificaram que carbendazim quando aplicado em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ foram eficientes no controle da PFC.

Quanto ao tratamento padrão, representado por difenoconazole, carbendazim e carbendazim aplicados em ‘cabeça-de-alfinete’, ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’, utilizado no Estado de São Paulo para controle da PFC, observou-se que não foi obtida uma eficiência superior em relação aos outros tratamentos. Este tratamento não diferiu estatisticamente dos melhores resultados, porém não diferiu também da testemunha. GOES et al. (2008), observaram que as aplicações de difenoconazole, mostraram resultados variáveis, sendo que possivelmente este resultado poderia ter sido uma consequência da grave pressão de doença, nas condições do experimento.

4.5. Conclusões

Os fungicidas sistêmicos, carbendazim, tiofanato-metílico e pyraclostrobin e o protetor folpet quando aplicados isoladamente em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ não diferiram entre si, portanto esses fungicidas tornam-se alternativas no controle da PFC.

As aplicações de erradicante ou protetor nos estádios, primórdio floral e 'cabeça-de-alfinete' em combinação com fungicidas sistêmicos em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' não diferiu das aplicações dos sistêmicos isoladamente, assim nas condições em que os experimentos foram executados, as aplicações de erradicantes ou de protetor tornou-se dispensável.

Não houve diferença entre três aplicações em 'cabeça-de-alfinete', 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' e, duas aplicações em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' de carbendazim, assim como, não houve diferença entre duas aplicações em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete' e uma aplicação em 'cotonete' de carbendazim, logo nas situações em que os experimentos foram realizados, uma única aplicação de carbendazim no estádio de 'cotonete' foi suficiente para o controle da doença.

A aplicação de fosfito em mistura em tanque com amônia quaternária 2 (cloreto de n-alquil-benzil-dimetilamônio) e, em combinação com carbendazim não proporcionou melhor resultado quando comparado com os outros tratamentos, deste modo esta mistura não otimizou o controle da doença PFC.

CAPÍTULO 5 – ATIVIDADE DE DIFERENTES FUNGICIDAS NO CONTROLE DE *Colletotrichum acutatum* EM CITROS

Resumo – A doença Podridão floral dos citros, cujo agente causal é *Colletotrichum acutatum* infecta pétalas e induz a abscisão de frutos jovens e a retenção de cálices. O controle dessa doença baseia-se essencialmente no uso de fungicidas aplicados na época da florada. Este estudo teve como objetivos avaliar o efeito dos fungicidas folpet e carbendazim na pós e pós-infecção e analisar a sensibilidade de isolados de *C. acutatum* ao carbendazim e pyraclostrobin, *in vitro*. A menor expressão de sintomas tanto em flores como na retenção de cálices deu-se na aplicação dos fungicidas folpet e carbendazim em ‘cabeça-de-alfinete’ e ‘cabeça-de-fósforo’ até 48 horas antes da inoculação. Isolados de *C. acutatum*, *in vitro*, apresentaram um crescimento micelial reduzido na presença de carbendazim, porém, o crescimento das colônias não foi completamente inibido, mesmo em dosagens altas, 10000 µg/mL. Entretanto para o fungicida pyraclostrobin, observou-se que não houve crescimento micelial dos isolados em todas as concentrações testadas. Portanto, isolados de *C. acutatum* mostraram-se altamente insensíveis ao carbendazim, ao contrário de pyraclostrobin, os quais foram sensíveis.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*, fungicidas, Podridão Floral dos Citros, resistência, sensibilidade

5.1. Introdução

Colletotrichum acutatum J.H. Simmonds é o agente causal da Podridão floral dos citros (PFC) ou Queda prematura dos frutos cítricos (QPFC). É uma doença comum nas regiões tropical e subtropical das Américas (TIMMER et al., 1994), sendo responsável por elevados prejuízos aos citricultores.

O controle da PFC baseia-se no uso de fungicidas nas fases críticas de suscetibilidade. Os fungicidas normalmente são aplicados nos diferentes estádios de florescimento floral, cujos resultados de controle muitas vezes mostram-se abaixo dos níveis desejáveis. Segundo GOES et al. (2008), em termos gerais os períodos mais críticos de suscetibilidade correspondem às fases de ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’. Segundo esses autores, nas fases que correspondente às de primórdios florais ou, especialmente, quando nas fases de flores abertas, os resultados de controle do patógeno não têm sido satisfatórios.

Atualmente os fungicidas normalmente empregados para o controle de *C. acutatum* são os dos grupos dos benzimidazóis, dicarboximidas e triazóis, além de algumas formulações prontas (BRASIL, 2009). Entretanto, dada a necessidade do uso intensivo desses fungicidas não apenas para o controle desse patógeno, como também de outros associados às plantas cítricas, é possível que, haja uma forte pressão de seleção, com possibilidade de um dos patógenos adquirir resistência a um dos princípios ativos.

Os fungos, por apresentarem grande maleabilidade genética, podem tornar-se resistentes a fungicidas (KIMATI, 1995). A resistência pode ser de laboratório ou de campo, porém, observações de resistência têm sido mal definidas por pesquisadores científicos ou por competidores comerciais em algumas ocasiões (BRENT, 1995). Portanto, alguns procedimentos devem ser seguidos no que se refere ao comportamento de um patógeno quando exposto a um determinado fungicida, seja em condições de laboratório, casa de vegetação ou campo.

Os fungicidas do grupo dos benzimidazóis prejudicam a divisão celular e nuclear, essencial ao crescimento micelial e produção de esporos (HASSAL, 1990; KENDALL et al., 1994; BRENT, 1995; WHEELER et al., 1995). As estrobilurinas agem através da inibição da respiração mitocondrial (BRENT, 1995; KOELLER, 1998; LEROUX, 1996; YPEMA & GOLD, 1999). Já os fungicidas de ação não-específica, como as dicarboximidas, atuam no resíduo da tiol cisteína e no bloqueio de resíduos essenciais de cisteína (KOELLER, 1998).

O presente estudo teve como objetivos (i) avaliar o efeito pós e pré-infeccional de *C. acutatum* aos fungicidas folpet e carbendazim em diferentes estádios de desenvolvimento de flores de laranja 'Pêra', sob condições de casa de vegetação; (ii) avaliar a sensibilidade *in vitro* de isolados de *C. acutatum* em relação a diferentes concentrações dos fungicidas carbendazim e pyraclostrobin.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Efeito pós e pré-infeccional de *Colletotrichum acutatum* aos fungicidas folpet e carbendazim

No presente estudo foi empregado o isolado P3B de *C. acutatum*, sabidamente patogênico conforme avaliações prévias. Para inoculação e tratamento, foram empregadas plantas de laranjeira 'Pêra', de cinco anos de idade, mantidas sob condições de casa de vegetação. As inoculações foram realizadas nos estádios de florescimentos designados de acordo com AGUSTI et al. (2000) em (i) 'cabeça-de-alfinete', (ii) 'cabeça-de-fósforo', (iii) 'cotonete' e (iv) flor aberta.

Inicialmente foi realizada inoculação com suspensão contendo 1×10^5 conídios/mL. A seguir, após 24, 48 e 72 horas da inoculação, procedeu-se os tratamentos dos órgãos florais com folpet (Folpan[®], 2g/L, Arysta LifeScience do Brasil Indústria Química e Agropecuária Ltda) e carbendazim (Derosal[®], 1mL/L, Bayer S.A) (pós-infecção). Os órgãos florais das plantas controle foram inoculados nas mesmas

condições anteriormente mencionadas, porém, não passaram por nenhum tratamento com fungicida.

Posteriormente, foram adotados procedimentos semelhantes aos anteriormente mencionados, porém, primeiramente foram realizados os tratamentos com os fungicidas, e, após, 24, 48 e 72 horas dos tratamentos foi efetuada a inoculação (pré-infecção). As testemunhas constituíram em órgãos florais exclusivamente tratados e não inoculados. Foram inoculados e, ou tratados pelo menos oito órgãos florais para cada estágio e período.

Posteriormente, e de forma semelhante ao descrito para as avaliações do efeito pós e pré-infeccional, foram adotados procedimentos semelhantes, porém, empregaram-se flores nos estádios de 'cotonete' e flor aberta. Da mesma forma, foram inoculados e tratados pelo menos oito órgãos florais.

Aproximadamente três horas antes da inoculação e dos tratamentos com fungicidas, as plantas foram mantidas sob nebulização, com 100% de umidade relativa. Cerca de duas horas após a inoculação e do tratamento com fungicidas, as plantas foram novamente mantidas sob nebulização, com 100% de umidade relativa durante 3 horas.

As avaliações consistiram na contagem do número de flores sintomáticas, expresso em porcentagem, após 3, 7, 15 e 20 dias da inoculação, ou do tratamento com fungicidas, de acordo com o estágio de florescimento. Adicionalmente, foi avaliado o número de cálices retidos, igualmente expresso em porcentagem, após a queda fisiológica dos frutos, cerca de 60 dias após a inoculação. Nesse presente estudo, não foram realizadas análises estatísticas dos dados, sendo as interpretações realizadas exclusivamente de forma comparativa.

5.2.2. Sensibilidade *in vitro* de *Colletotrichum acutatum* aos fungicidas carbendazim e pyraclostrobin

No presente estudo, foram avaliados 42 isolados de *C. acutatum*, das variedades de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), Pêra (P), Natal (N), Valência (V), Folha

Murcha (FM), Lima (L), Lima Verde (LV), Baía (B) e Hamlin (H). A procedência dos isolados foi de pomares localizados nos municípios de Itapetininga (I), Santa Cruz do Rio Pardo (S) e Brotas (B), no Estado de São Paulo (Tabela 1). Para tal, a partir de colônias do fungo mantidas em meio BDA por sete dias a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob luz contínua, foram removidos discos de 5 mm de diâmetro das margens de ativo crescimento. Posteriormente, tais discos foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA mais fungicida.

Tabela 1. Relação dos isolados de *Colletotrichum acutatum* avaliados quanto à sensibilidade *in vitro* aos fungicidas carbendazim e pyraclostrobin

Relação dos isolados		
P2B	L9B	N7I
P3B	LV2B	N11I
P7B	LV3B	V4I
N1B	LV6B	V9I
N6B	B2B	V13I
N9B	B5B	P6S
V3B	B7B	P8S
V7B	H2B	P10S
V10B	H3B	N1S
FM1B	H10B	N2S
FM7B	P2I	N4S
FM10B	P5I	V5S
L5B	P11I	V9S
L7B	N3I	V10S

P: 'Pêra'; N: 'Natal'; V: 'Valência'; FM: 'Folha Murcha'; L: Lima; LV: 'Lima Verde'; B: 'Baía'; H: 'Hamlin'.
B: Brotas; I: Itapetininga; S: Santa Cruz do Rio Pardo.

Os fungicidas avaliados foram carbendazim (Derosal[®], 1mL/L, Bayer S.A) e pyraclostrobin (Comet[®], 0,15 mL/L, Basf S.A.) a 1000, 5000 e 10000 µg/mL. Para o preparo do meio de cultura acrescido com fungicida empregou-se metodologia semelhante à adotada por EDIGTON et al. (1971), modificada por MENTEN et al. (1976), a qual consistiu na obtenção de solução estoque dos fungicidas, seguido de

diluições seriadas para a obtenção da concentração desejada. Tais placas, após o preparo foram mantidas em B.O.D. na temperatura a qual as colônias seriam incubadas, de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob luz contínua por quatro horas. Após tal período é que se procedeu a deposição dos discos de colônias, sendo mantidos nessas condições apontadas, sob luz contínua por sete dias.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial $42 \times 2 \times 3$ (isolados, fungicidas e dosagens), com três repetições. Cada unidade amostral foi representada por uma placa. As médias foram comparadas através do teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$). As avaliações consistiram na determinação do tamanho das colônias após sete dias de incubação.

5.3. Resultados

5.3.1. Efeito pós e pré-infeccional de *Colletotrichum acutatum* aos fungicidas folpet e carbendazim

As porcentagens de flores sintomáticas e cálices retidos produzidos na pós e pós-infecção com os fungicidas folpet e carbendazim do primeiro ensaio encontram-se representados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

O fungicida folpet quando aplicado depois da inoculação não apresentou sintomas nas flores em 'cabeça de alfinete', e, verificou-se baixa porcentagem de flores com sintomas nos tratamentos efetuados 48 (20%) e 72 horas (12%) depois da inoculação, em 'cabeça-de-fósforo'. Em 'cotonete' e flor aberta constatou-se a presença de flores sintomáticas desde a testemunha (0), 82 e 100%, respectivamente, até o tratamento realizado 72 horas posteriormente a inoculação (Figura 1A). Quanto à formação de 'estrelinhas', observou-se que a testemunha apresentou sintomas em 'cotonete' e flor aberta (100%). Nos tratamentos realizados após 24, 48 e 72 da inoculação, verificou-se a presença de cálices retidos em porcentagem alta,

principalmente quando inoculado em 'cabeça-de-fósforo', 'cotonete' e flor aberta (Figura 1B).

Quando do tratamento com folpet e depois a inoculação notou-se que a testemunha apresentou sintomas em flores somente em flor aberta (32%), sintomas em 'cabeça de alfinete' não foram expressos em flores e baixa porcentagem foi observada em cabeça-de-fósforo' nas inoculações realizadas 48 (15%) e 72 (15%) horas do tratamento (Figura 1C). Observou-se a formação de cálices retidos em todos os estádios 72 horas da inoculação após o tratamento (Figura 1D), porém a porcentagem foi menor comparando-se com a produção de cálices retidos quando houve o tratamento depois da inoculação (Figura 1B). Quanto a testemunha e os tempos, 24, 48 e 72 horas, a maior porcentagem foi observada em 'flor aberta' (Figura 1D).

Com relação ao carbendazim, quando inoculado antes de tratar, ressalta-se que não houve produção de flores sintomáticas em 'cabeça-de-alfinete' e 'cabeça-de-fósforo', porém nos estádios 'cotonete' e flor aberta observaram-se elevadas porcentagens em todos os tempos (Figura 2A), assim como, na formação de cálices retidos (Figura 2B). Percebeu-se produção de cálices aderidos em todos os tratamentos com carbendazim, 0, 24, 48 e 72 horas depois da inoculação (Figura 2B).

Mediante o tratamento com carbendazim antes da inoculação, notou-se que em 'cabeça-de-alfinete', os sintomas deram-se somente na produção de 'estrelinhas' após 72 horas (15%) (Figuras 2C e 2D). A porcentagem de flores sintomáticas e de cálices retidos quando tratado com carbendazim e depois inoculado foi menor em relação aos resultados de quando inoculado e depois tratado (Figuras 2A e 2B), apesar que quando inoculado com 72 horas após o tratamento em 'cotonete' e flor aberta, as porcentagens de cálices retidos ainda foram altas (Figura 2D).

Em todas as avaliações verificou-se que a maior porcentagem de sintomas foi observada em 'cotonete' e flor aberta, enquanto que a menor o foi em 'cabeça-de-alfinete' e, por essa razão, o experimento foi repetido para 'cotonete' e flor aberta.

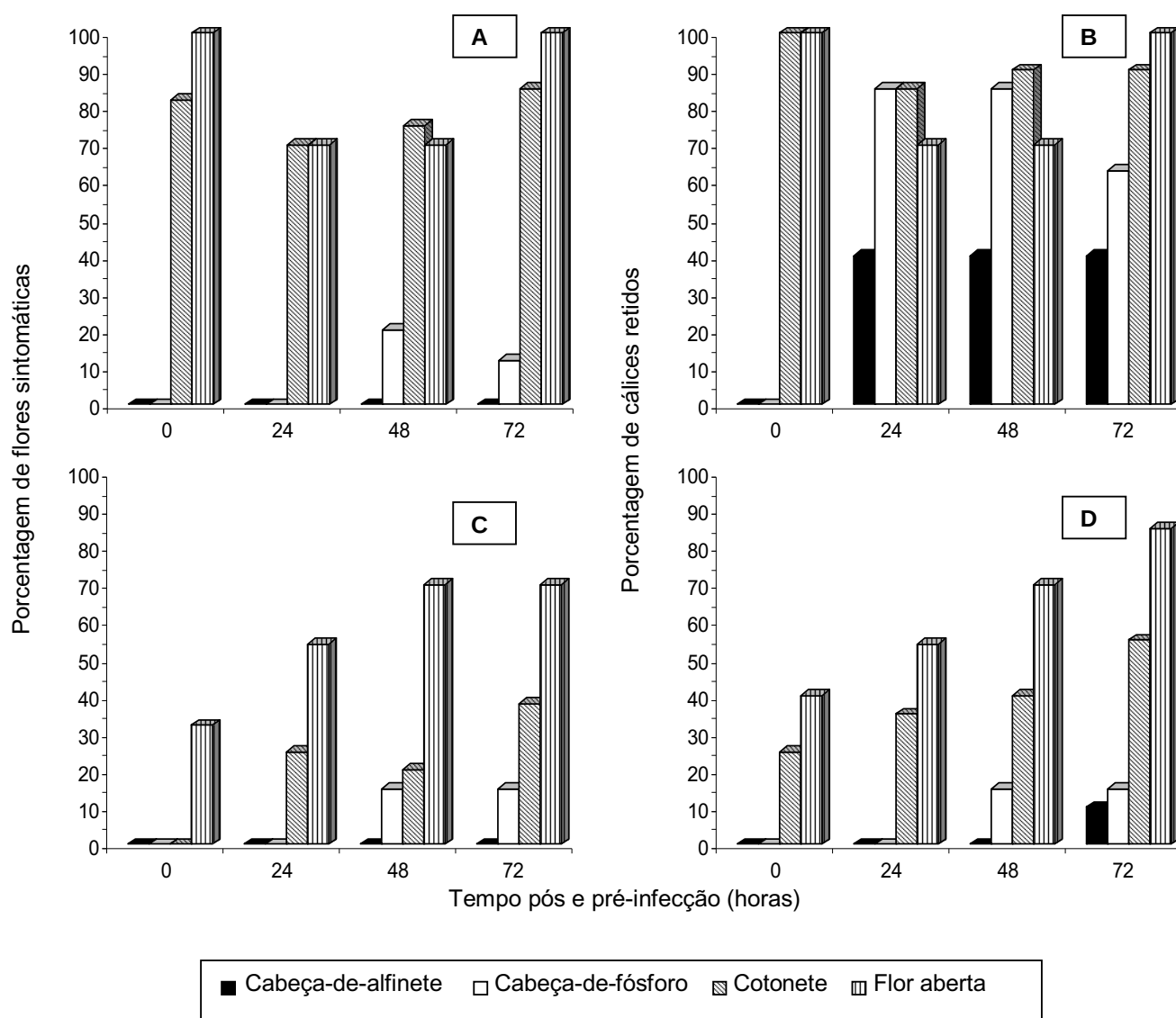


Figura 1. A – Porcentagem de flores de laranja 'Pêra' inoculada com *Colletrotrichum acutatum*, seguido de tratamento sob a forma de pulverização com folpet após 24, 48 e 72 horas. B – Porcentagem de cálices retidos de laranja 'Pêra' inoculada com *Colletrotrichum acutatum*, seguido de tratamento sob a forma de pulverização com folpet após 24, 48 e 72 horas. C - Porcentagem de flores de laranja 'Pêra' tratada sob a forma de pulverização com folpet e após 24, 48 e 72 horas inoculada com *Colletrotrichum acutatum*. D – Porcentagem de cálices retidos de laranja 'Pêra' tratada sob a forma de pulverização com folpet e após 24, 48 e 72 horas inoculada com *Colletrotrichum acutatum*.

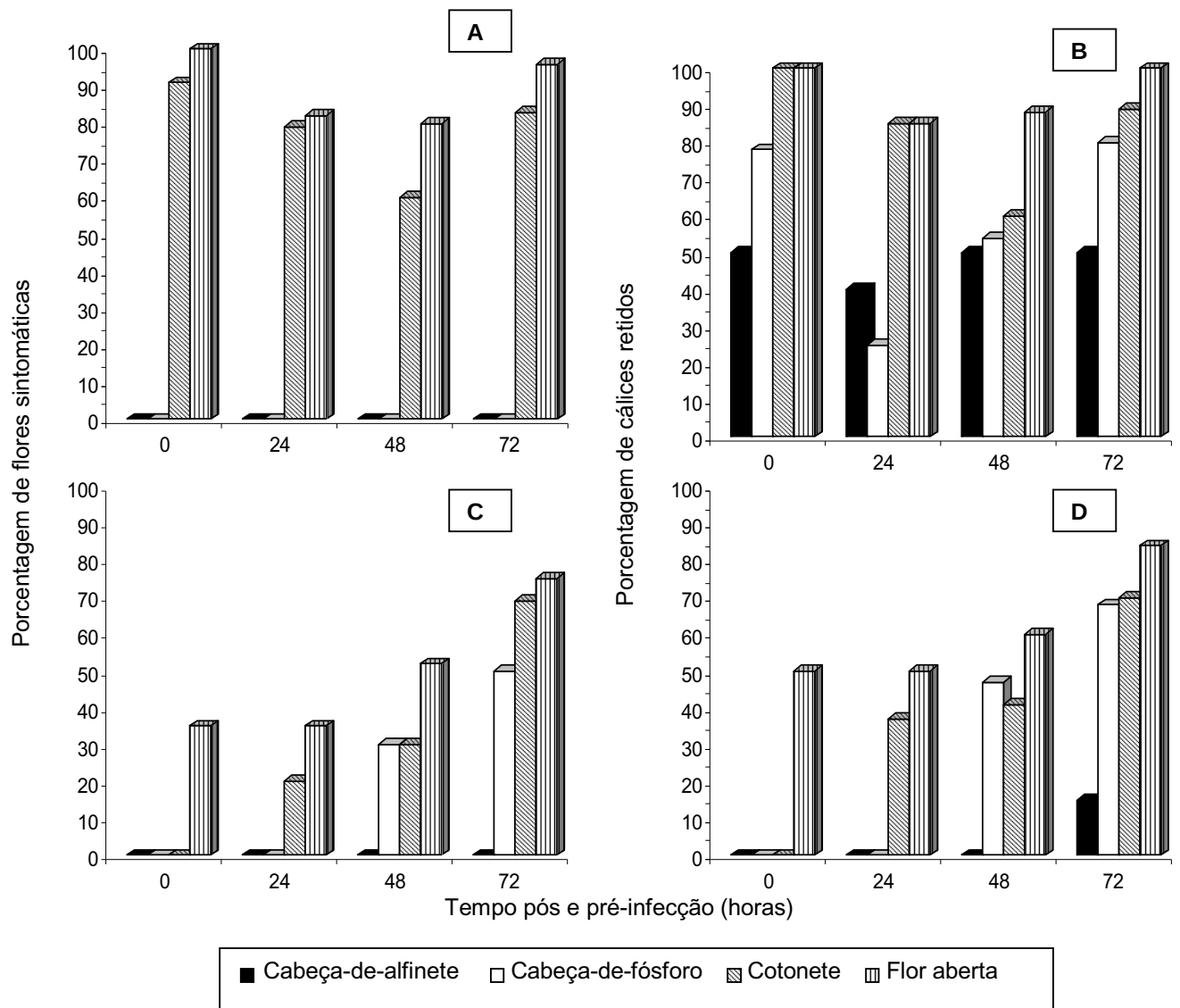


Figura 2. A – Porcentagem de flores de laranja 'Pêra' inoculada com *Colletotrichum acutatum*, seguido de tratamento sob a forma de pulverização com carbendazim após 24, 48 e 72 horas. B – Porcentagem de cálices retidos de laranja 'Pêra' inoculada com *Colletotrichum acutatum*, seguido de tratamento sob a forma de pulverização com carbendazim após 24, 48 e 72 horas. C - Porcentagem de flores de laranja 'Pêra' tratada sob a forma de pulverização com carbendazim e após 24, 48 e 72 horas inoculada com *Colletotrichum acutatum*. D – Porcentagem de cálices retidos de laranja 'Pêra' tratada sob a forma de pulverização com carbendazim e após 24, 48 e 72 horas inoculada com *Colletotrichum acutatum*.

Os dados correspondentes ao efeito pós e pré-infeccional de *C. acutatum* aos fungicidas folpet e carbendazim quando inoculados em 'cotonete' e flor aberta encontram-se apresentados nas Figuras 3 e 4. Nota-se que as porcentagens de flores sintomáticas e cálices retidos em 'cotonete' e flor aberta foram menores quando comparados ao primeiro ensaio. Na utilização de folpet depois da inoculação (Figuras 3A e 3B) observou-se que as maiores porcentagens na expressão de sintomas foi na testemunha (100%) e no tratamento depois de 72 horas da inoculação. Nos outros tempos, 24 e 48 horas o controle foi efetivo, acima de 50%. Quando ocorreu primeiro o tratamento com folpet e depois foi feita a inoculação (Figuras 3C e 3D), verificou-se baixas porcentagens de sintomas em todos os tempos.

O mesmo foi observado na aplicação de carbendazim (Figura 4). Quando a aplicação do fungicida deu-se após a inoculação, as plantas correspondentes à testemunha apresentaram altas taxas na expressão de sintomas. Todavia, o contrário deu-se quando inicialmente deu-se o tratamento, e posteriormente a inoculação. O tratamento com fungicida 72 horas após a inoculação também apresentou elevada porcentagem principalmente na produção de cálices retidos (Figura 4B). Na utilização de carbendazim antes da inoculação, observou-se um bom controle principalmente no que diz respeito à inoculação 24 e 48 após o tratamento.

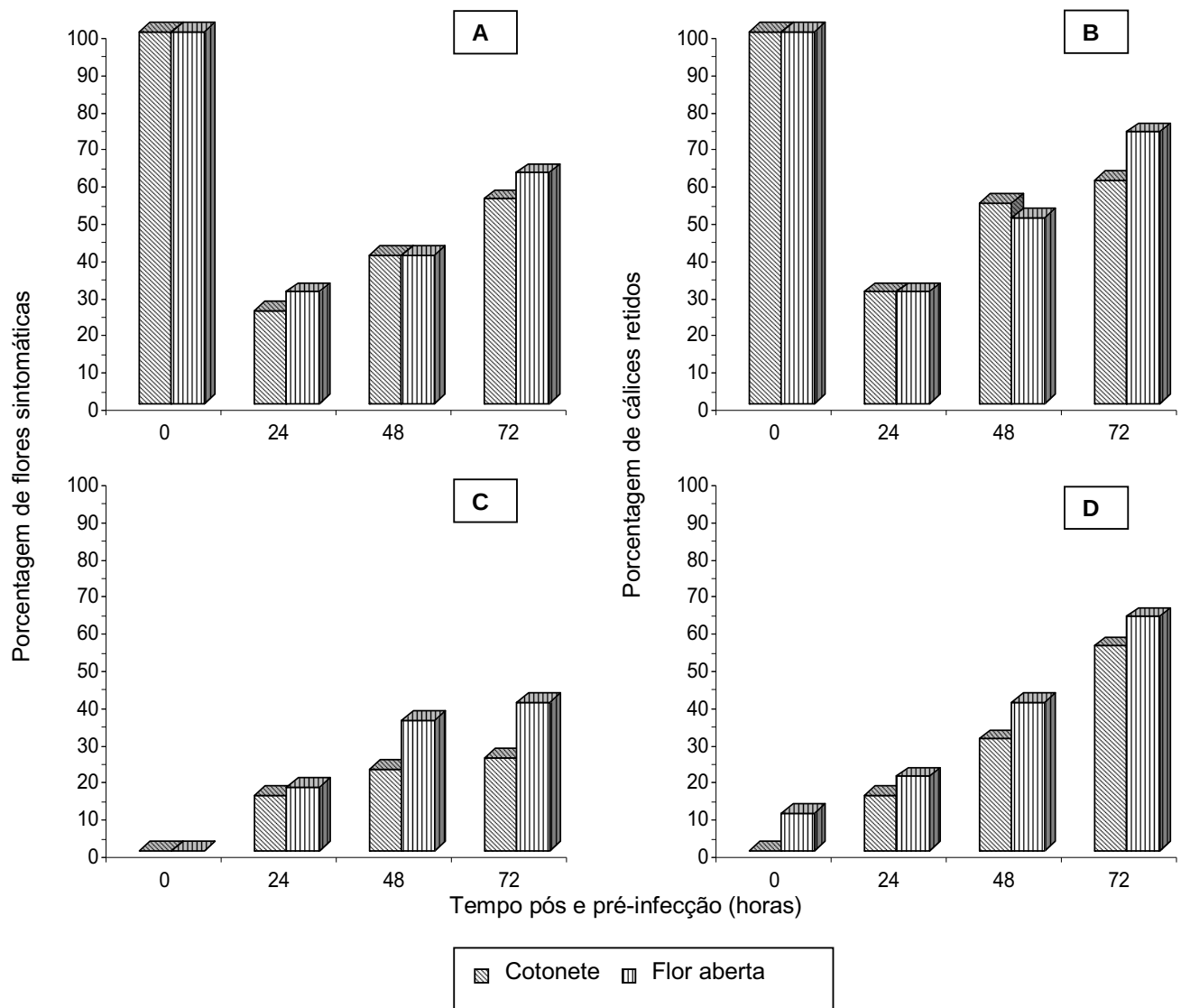


Figura 3. A – Porcentagem de flores de laranja 'Pêra' inoculada com *Colletotrichum acutatum*, seguido de tratamento sob a forma de pulverização com folpet após 24, 48 e 72 horas. B – Porcentagem de cálices retidos de laranja 'Pêra' inoculada com *Colletotrichum acutatum*, seguido de tratamento sob a forma de pulverização com folpet após 24, 48 e 72 horas. C – Porcentagem de flores de laranja 'Pêra' tratada sob a forma de pulverização com folpet e após 24, 48 e 72 horas inoculada com *Colletotrichum acutatum*. D – Porcentagem de cálices retidos de laranja 'Pêra' tratada sob a forma de pulverização com folpet e após 24, 48 e 72 horas inoculada com *Colletotrichum acutatum*.

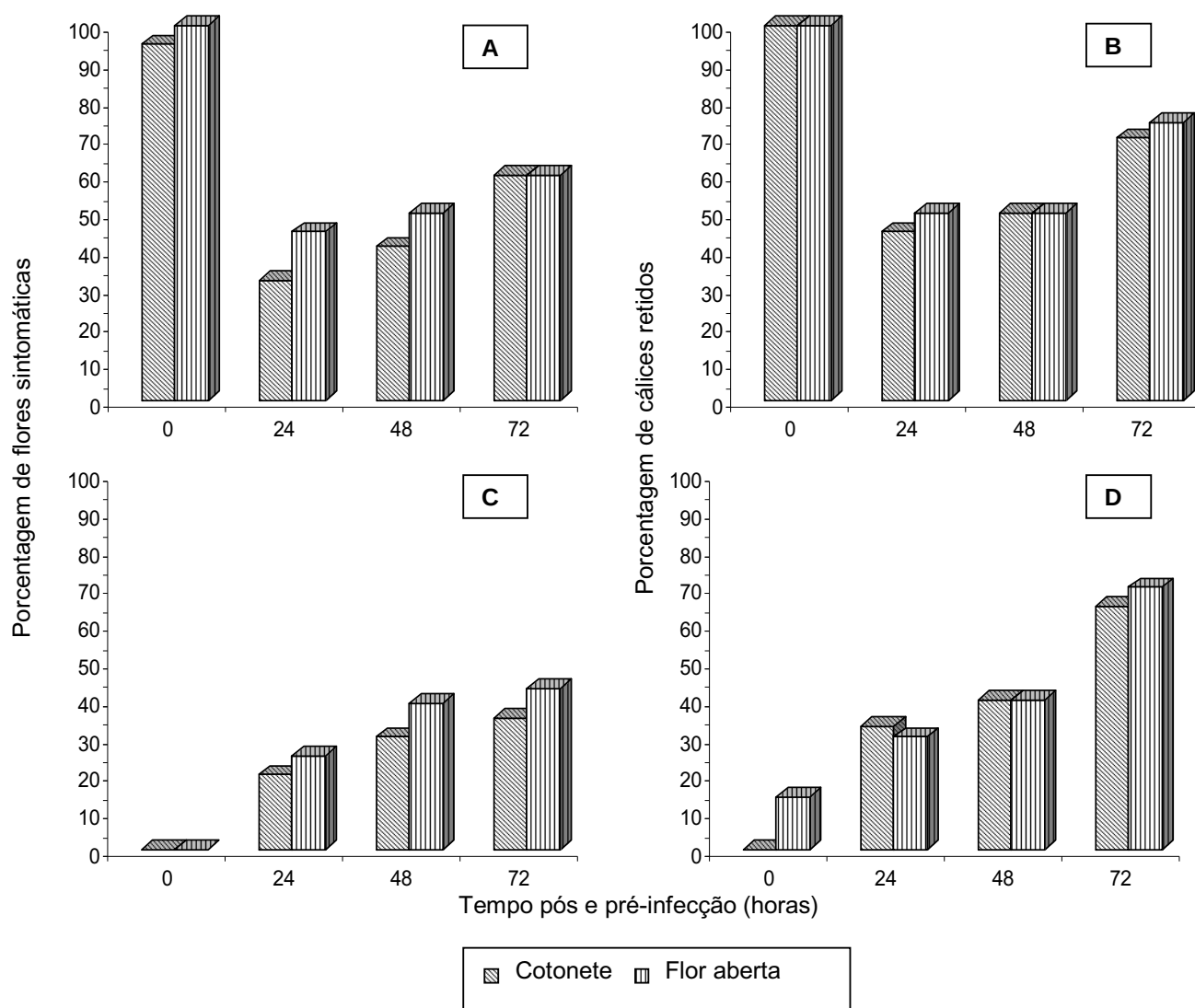


Figura 4. A – Porcentagem de flores de laranja 'Pêra' inoculada com *Colletotrichum acutatum*, seguido de tratamento sob a forma de pulverização com carbendazim após 24, 48 e 72 horas. B – Porcentagem de cálices retidos de laranja 'Pêra' inoculada com *Colletotrichum acutatum*, seguido de tratamento sob a forma de pulverização com carbendazim após 24, 48 e 72 horas. C - Porcentagem de flores de laranja 'Pêra' tratadas sob a forma de pulverização com carbendazim e após 24, 48 e 72 horas inoculada com *Colletotrichum acutatum*. D – Porcentagem de cálices retidos de laranja 'Pêra' tratada sob a forma de pulverização com carbendazim e após 24, 48 e 72 horas inoculada com *Colletotrichum acutatum*.

5.3.2. Sensibilidade *in vitro* de *Colletotrichum acutatum* aos fungicidas carbendazim e pyraclostrobin

Apesar de fungo ter tido o crescimento micelial reduzido na presença de carbendazim, o crescimento das colônias de *C. acutatum* não foi completamente inibido, mesmo em dosagens muito altas, 10000 µg/mL. Verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os isolados no que diz respeito ao crescimento micelial quando na presença de carbendazim (Tabela 2).

No caso do fungicida pyraclostrobin, observou-se que não houve crescimento micelial dos isolados em todas as concentrações testadas (Tabela 2).

Verificou-se correlação negativa significativa entre o crescimento micelial dos isolados de *C. acutatum* e as dosagens crescentes do fungicida carbendazim ($P \leq 0,01$; $R^2 = 0,522$) (Figura 5). Observou-se que houve aumento na inibição do crescimento micelial do fungo à medida que se elevaram as doses do fungicida. Desse modo, a maior inibição foi observada a 10000 µg/mL.

Tabela 2. Médias do crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum acutatum* na avaliação do efeito de diferentes dosagens, 1000, 5000 e 10000 µg/mL, dos fungicidas carbendazim e pyraclostrobin.

Dosagens (µg/mL)	Fungicidas	
	Carbendazim	Pyraclostrobin
1000	2,95 aA	0,00 aB
5000	0,96 bA	0,00 aB
10000	0,23 cA	0,00 aB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott ($P \geq 0,05$).

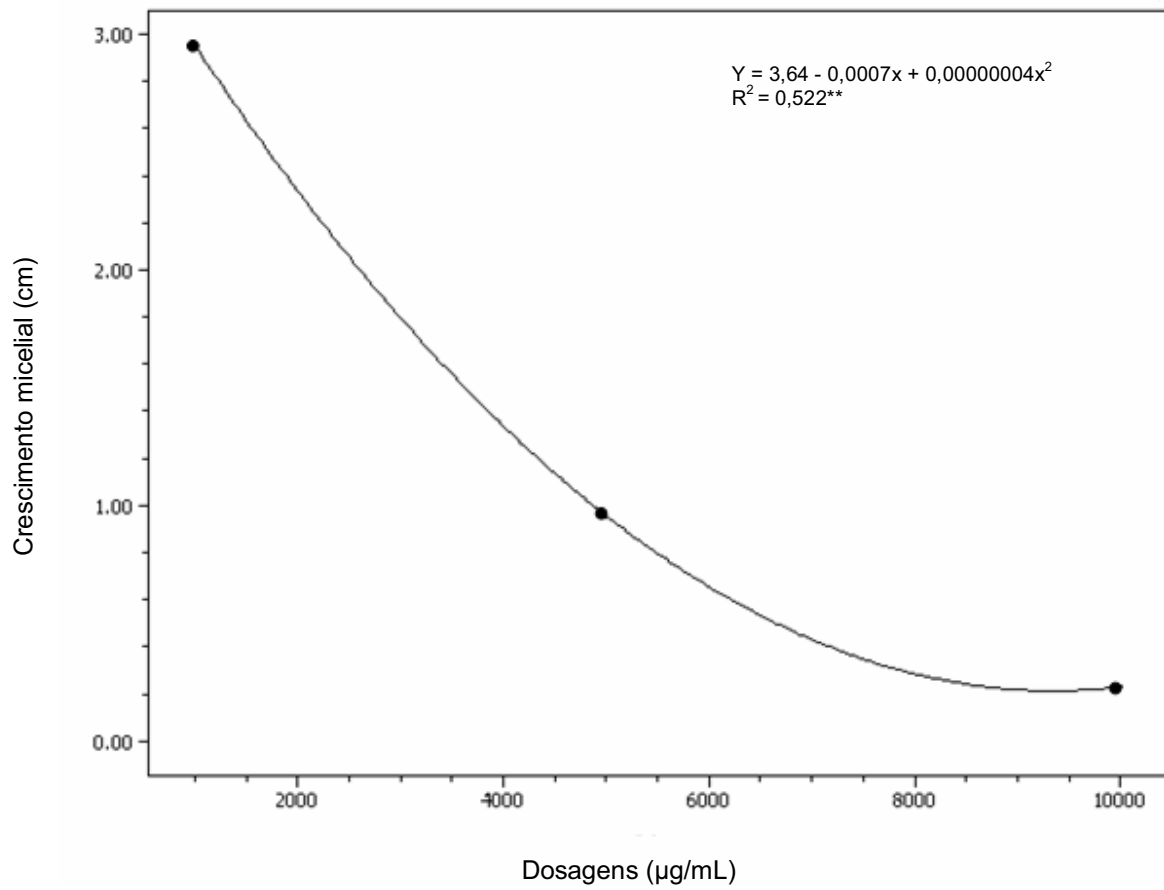


Figura 5. Efeito de dosagens crescentes do fungicida carbendazim no crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum acutatum*.

5.4. Discussão

Para os dois ensaios com base na atividade dos fungicidas folpet e carbendazim na pós e pré-infecção, verificou-se melhor controle da doença na pré-infecção até 48 horas para os dois fungicidas. Quanto aos estádios de florescimento, a melhor eficiência pode ser observada quando tratado em ‘cabeça-de-alfinete’ e ‘cabeça-de-fósforo’.

Segundo GOES et al. (2008) carbendazim e folpet quando aplicados em ‘cabeça-de-fósforo’ e ‘cotonete’ foram eficientes no controle da PFC em condições de campo. A condição ambiental extremamente favorável ao patógeno na presente pesquisa, possivelmente limitou a eficiência dos produtos. A longevidade dos fungicidas pode ser reduzida especialmente por causa da diluição e, ou lixiviação (GOES et al., 2008). Assim sendo, longos períodos de chuva durante o florescimento que dificultam o planejamento e a execução das pulverizações, podem também limitar a eficiência do produto.

A ação do fungicida folpet pertencente ao grupo das carboximidas, é não-específica, ou seja, ele é efetivo por mais de um modo de ação. Uma das características desses fungicidas é induzir pouco ou nenhum risco de resistência. Aceita-se que, o declínio de sensibilidade em fungicidas de ação não-específica é geralmente causado por adaptação fenotípica (BRENT, 1995). Logo que, a eficiência em algumas ocasiões quando na aplicação de folpet não foi satisfatória, pode-se atribuir não somente as condições ambientais, bem como a uma possível adaptação fenotípica. Apesar que, consta na literatura alguns relatos de resistência quanto a fungicidas de ação não-específica (GEORGOPOULUS, 1977; COCKERELL et al., 1994), para tanto, há necessidade de vários estudos, inclusive em laboratório, seguindo alguns procedimentos (BRENT, 1995) para melhor compreensão.

Já com relação aos benzimidazóis, grupo químico o qual pertence o carbendazim, com seu uso intensivo e generalizado, inúmeros casos de resistência

começaram a aparecer (SMITH, 1994). Os mecanismos de ação envolvidos na resistência de fungos a fungicidas são ainda pouco conhecidos, porém sabe-se que, estes mecanismos estão associados aqueles interferidos pelos fungicidas (GHINI & KIMATI, 2000).

No estudo referente ao efeito de carbendazim e pyraclostrobin quanto a inibição do crescimento micelial, observou-se baixa eficiência de carbendazim mesmo em altas concentrações do fungicida, enquanto que na presença de pyraclostrobin, os isolados foram igualmente sensíveis as diferentes dosagens, ou seja, não houve crescimento micelial.

De acordo com alguns autores, *C. acutatum* em citros demonstrou baixa sensibilidade ao benomyl *in vitro* (SONODA & PELOSI, 1988; RODRIGUES & LEON, 1993; GOES & KIMATI, 1998; PERES et al., 2002; PERES et al., 2004). Um mesmo fator genético pode conferir resistência a dois ou mais fungicidas com mecanismo de ação semelhante, porém a detecção de resistência exige comprovar a presença de linhagens resistentes (DEKKER, 1995), uma vez que outros fatores podem afetar o desempenho de fungicidas (GHINI & KIMATI, 2000).

GOES & KIMATI (1998) atribuíram à baixa eficiência de benomyl *in vitro*, porém significativamente expressiva em condições de campo, a atividade hormonal do fungicida e inibição da cutinase. A mesma situação é observada para carbendazim, controle ineficiente do crescimento micelial *in vitro*, porém quando em condições de campo o fungicida comporta-se de forma eficiente. Além disso, observou-se que na presença de carbendazim *in vitro*, os isolados apresentaram visivelmente tendência a maior esporulação.

A baixa sensibilidade observada entre os isolados na presença de carbendazim, bem como, a inferior eficiência no controle, notada algumas vezes deste fungicida quando aplicado em plantas em casa de vegetação não pode ser conferida a resistência ao fungicida. Outros fatores como descritos por GHINI & KIMATI (2000) podem interferir no comportamento do fungicida, assim como, outros procedimentos devem ser acompanhados (BRENT, 1995) que permitam conclusões definitivas, comprovando qualquer relação dessa natureza.

5.5. Conclusões

A menor expressão de sintomas tanto em flores como na retenção de cálices deu-se na aplicação dos fungicidas folpet e carbendazim em ‘cabeça-de-alfinete’ e ‘cabeça-de-fósforo’ até 48 horas antes da inoculação.

Isolados de *C. acutatum* mostraram-se altamente insensíveis ao carbendazim, ao contrário de pyraclostrobin, os quais foram sensíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASKAVEG, J.E.; FÖRSTER, H. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Eds.). ***Colletotrichum*: host specificity, pathology and host-pathogen interactions**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. p. 317-336.

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 11, p. 1176-1178, 1992.

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 4, p. 420-425, 1994.

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 11, p. 1377-1382, 1992.

AGOSTINI, J.P., GOTTWALD, T.R., TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 5, p. 485-490, 1993.

AGRIANUAL 2009. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, Consultoria & Comércio, 2009. p. 267-300.

AGUSTI, M.; ZARAGOZA, S.; BLEIHOLDER, H.; BUHR, L.; HACK, H.; KLOSE, R.; STAUB, R. The BBCH scale for describing phenological stages in citrus development.

In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 2000, Orlando. **Proceedings...** Orlando: Proceedings of International Society of Citriculture, ISC, 2000. p. 445-446.

ASSOCITRUS. **Associação Brasileira de Citricultores.** Disponível em <<http://www.associtrus.com.br>>. Acesso em: 01 de ago. 2009.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: conseqüências para a resistência a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 119-127, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.** AGROFIT. Disponível em: <http://www.extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 ago. 2009.

BRENT, K.J. Detection and monitoring of resistant forms: an overview. In: **Pesticide resistance-strategies and tactics for management.** Washington: National Academic Press, 1986. p. 298-312.

BRENT, K.J. Monitoring for fungicide resistance. In: DELP, C.J. (Ed.). **Fungicide resistance in North America.** St. Paul: American Phytopathological Society Press, 1994. p. 9-11.

BRENT, K.J. **Fungicide resistance in crop pathogens:** how it can be managed? Brussels: GCPF, 1995. 54p. (FRAC Monograph 1).

BRENT, K.J. & HOLLOMON, D.W. **Fungicide resistance:** the assessment of risk. Brussels: GCPF, 1998. 50p. (FRAC Monograph 2).

BROWN, G.E. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. **Phytopathology**, St. Paul, v. 65, p. 404-409, 1975.

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of Slow-Growing Orange and Key Lime Anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 5, p. 523-527, 1996.

CANNON, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. Liking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: Prusky, D.; Freeman, S; Dickman, M.B. **Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. cap. 5, p. 317-336.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHUNG, K.R.; YUAN, R.; BURNS, J.K.; TIMMER, L.W. Involvement of hormones in symptomatology of postbloom fruit drop (PFD) of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, supl., p. 15, 2002.

CHUNG, K.R.; SHILTS, T.; ERTURK, U.; TIMMER, L.W.; UENG, P.P. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. **FEMS Microbiology Letters**. New York: John Wiley & Sons, v. 226, p. 23-30, 2003.

COCKERELL, V.; RENNIE, W.R.; JACKS, M. Incidence and control of organo-mercury resistant *Pyrenophora graminis* in Scottish spring barley 1988-1992. In: HEANEY, S. SLAWSON, D.; HOLLOMON, D.W.; SMITH, M.; RUSSEL, P.E.; PARRY, D.W. (Eds.). **Fungicide Resistance**. BCPC Monograph, n. 60, 1994. p. 379-382.

DeMARSAY, A.; OUDEMANS, P.V. *Colletotrichum acutatum* infections in dormant highbush blueberry buds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, supl., p. 20, 2003.

DeMARSAY, A.; OUDEMANS, P.V. Blueberry anthracnose: From bud infection to fruit rot. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, supl., p. 25, 2004.

DENHAM, T.G. Citrus production and premature fruit drop disease in Belize. **Pans**, London, v. 25, n. 1, p. 30-36, 1979.

DENHAM, T.G.; WALLER, J.M. Some epidemiological aspects of postbloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 98, n. 1, p. 65- 77, 1981.

DORNELLES, C.M.M. O problema da queda prematura de frutos jovens de citros no Rio Grande do Sul. In: MESA REDONDA PARA ESTUDO DA QUEDA DE FRUTOS JOVENS EM CITROS. Taquari, 1977. p. 3-6.

EASTBURN, D.M.; GUBLER, W.D. Strawberry anthracnose: Detection and survival of *Colletotrichum acutatum* in soil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 74, n. 2, p.161-163, 1990.

EDGINGTON, L.V.; MARTIN, R.A.; BRUIN, G.C. PARSONS, I.M. Systemic fungicides: a perspective after 10 years. **Plant Disease**, St. Paul, v. 64, n. 1, p. 19-23, 1980.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop: a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology**, London, v. 91, n. 1, p. 13-20, 1979.

FAGAN, H.J. Strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Belize. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 74, p. 643-644. 1980.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: I. Disease Epidemiology. **Turrialba**, Turrialba, v. 34, n. 2, p. 173-177, 1984a.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial and ground spraying. **Turrialba**, Turrialba, v. 34, n. 2, p. 179-186, 1984b.

FAWCETT, H.S. **Citrus diseases and their control**. New York and London, Mc Graw, 656p. 1936.

FEICHTENBERGER, E. Queda dos frutos jovens de citros, doença induzida por uma raça virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 12, n. 2, p. 513-521, 1991.

FEICHTENBERGER, E. Podridão floral dos citros: histórico, sintomatologia, etiologia e epidemiologia. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, n. 2, p. 109-28, 1994.

FREEMAN, S.; SHABI, E.; KATAN, T. Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of anemone (*Anemone coronaria* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5267-5272, 2000.

FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 10, p. 986-992, 2001.

FREEMAN, S.; SHALEV, Z.; KATAN, J. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 9, p. 965-970, 2002.

GALLI, M.A.; PARADELA, A.L.; SIMA, Jr., J.C.; SALVO, S.; SCHERB, C.T. Avaliação de fungicidas no controle da podridão floral (*Colletotrichum acutatum*) em limão Taiti (*Citrus lantifolia*). **Revista Ecosystema**, Pinhal, v. 27, n. 1/2, p. 67-68, 2002.

GANTOTTI, B.V.; DAVIS, M.J. Detection of pectinase isozyme polymorphism in *Colletotrichum gloeosporioides* from citros. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 1170, 1991.

GEORGOPOULUS, S.G. Development of fungal resistance to fungicides. In: SIEGEL, M.R.; SISLER, H.D. (Eds.). **Antifungal compounds**. New York and Basel: Marcel Dekker Inc., v. 2, 1977, p. 439-495.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: EMBRAPA-FRAC, 2000. 78p.

GOES, A. **Queda prematura dos frutos cítricos: caracterização do agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. [Sensu Arx, 1957], e controle da doença.** 1995. 143f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* associados à Queda Prematura dos Frutos Cítricos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 4-9, 1997a.

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e de *C. gloeosporioides*, obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 10- 14, 1997b.

GOES, A.; KIMATI, H. *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos: resistente ou insensível ao benomyl? **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n. 3/4, p. 246-253, 1998.

GOES A.; CRESTE J.E. Uso do sistema integrado de diagnose e recomendação (DRIS) na avaliação de folhas de plantas cítricas com sintomas de queda prematura de frutos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, p. 237-240, 2000.

GOES, A.; KUPPER, K.C. Controle das doenças causadas por fungos e bactérias na cultura dos citros. In. ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado: fruteiras tropicais – Doenças e Pragas**. Viçosa, 2002. p. 353-412.

GOES, A.; MORETTO, K.C.K.; WIT, C.V.P. de. Effect of ferbam alone or in combination with benomyl for control of citrus postbloom fruit drop. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 2000, Orlando. **Proceedings...** Orlando: Proceedings of International Society of Citriculture, ISC, 2000. p.145-145.

GOES, A.; GARRIDO, R.B.O.; REIS, R.F.; BALDASSARI, R.B.; SOARES, M.A. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for

control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. **Crop Protection**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 71–76, 2008.

GUERBER, J.C.; LIU, B.; CORRELL, J.C.; JOHNSTON, P.R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, Lawrence, v. 95, n. 5, p. 872-895, 2003.

HAIR, J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W. **Análise multivariada de dados**. Porto Alegre. Bookman, 2005.

HASSAL, K.A. **The biochemistry and uses of pesticides**: structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection. London: MacMillan Press, 1990. 365p.

HEANEY, S; SLAWSON, D.; HOLLOMON, D.W.; SMITH, M.; RUSSEL, P.E. PARRY, D.W. (Eds.). **Fungicide resistance**. Farnham: The British Crop Protection Council, 1994. (Monograph 60).

HEWITT, H.G. (1998). **Fungicides in Crop Protection**. Wallingford: CAB International., 1988. 221p.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 7, p. 743-749, 2002.

KENDALL, S.J.; HOLLOMON, D.W. Fungicide resistance. In: HUTSON, D.H.; MIYAMOTO, J. (Eds.). **Fungicide Activity**. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 87–108.

KENDALL, S.; HOLLOMON, D.W.; ISHII, H.; HEANEY, S.P. Characterization of benzimidazole-resistant strains of *Rhynchosporium secalis*. **Pesticide Science**, New York, v. 40, n. 3, p. 175-181, 1994.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, cap. 38, p. 761-785.

KOLLER, W. Chemical approaches to managing plant pathogens. In: RUBERSON, J.R. (Ed.). **Handbook of Integrated Pest Management**. New York: Dekker, 1998. p. 1-38.

KURAMAE-IZIOKA, E.E.; LOPES, C.R.; SOUZA, N.L.; MACHADO, M.A. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p. 323-329, 1997.

LEANDRO, L.F.S.; GLEASON, M.L.; NUTTER, F.W.Jr.; WEGULO, S.N.; DIXON, P.M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 7, p. 659-664, 2001.

LEANDRO, L.F.S.; GLEASON, M.L.; NUTTER, F.W.Jr.; WEGULO, S.N.; DIXON, P.M. Influence of temperature and wetness duration on conidia and appressoria of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 4, p. 513-520, 2003a.

LEANDRO, L.F.S.; GLEASON, M.L.; NUTTER, F.W.Jr.; WEGULO, S.N.; DIXON, P.M. Strawberry plant extracts stimulate secondary conidiation by *Colletotrichum acutatum* on symptomless leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 10, p. 1285-1291, 2003b.

LEROUX, P. Recent development in the mode of action of fungicides. **Pesticide Science**, New York, v. 47, p. 191-197, 1996.

LI, W.; YUAN, R.; BURNS, J.K.; TIMMER, L.W.; CHUNG, K.R. Genes for hormone biosynthesis and regulation are highly expressed in citrus flowers infected with the fungus *Colletotrichum acutatum*, causal agent of postbloom fruit drop. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, p. 578-583, 2003.

LIYANAGE, H.D.; McMILLAN, R.T.; KISTLER, H.C. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 11, p. 1371-1376, 1992.

LIYANAGE, H.D.; KÖLLER, W.; McMILLAN, R.T.; KISTLER, H.C. Variation in cutinase from two populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 1, p. 113-1166, 1993.

McMILLAN, Jr., R.T. Evaluation of fungicides for control of postbloom fruit drop of "Tahiti" limes caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v. 104, p. 160-161, 1991.

McMILLAN, Jr., R.T.; TIMMER, L.W. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 73, n. 1. p. 81, 1989.

MELO, M.B. de; MORAIS, C.F.M. de. Controle químico da queda de frutos jovens de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 11, 1991, Petrolina. **Programas e resumos...** Petrolina: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1991. n.p.

MENTEN, J.O.M.; MACHADO, C.C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.1, n.1, p.57-66, 1976.

MILLS, P.R.; HODSON, A.; BROWN, A.E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruit. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Eds.). **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 269-288.

MOITA NETO, J.M.; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

NECHET, K.L. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** 1999. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 1999.

NEVES, M.F.; JANK, M.S. **Desafios na coordenação na citricultura brasileira.** ICONE, p. A-10, 2006.

NORMAN, D.J.; STRANDBERG, J.O. Survival of *Colletotrichum acutatum* in soil and plant debris of leather leaf fern. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 10, p. 1177-1180, 1997.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.).** 1991. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 1991.

OROZCO SANTOS, M.; GONZÁLEZ GARZA, R. Caída de fruto pequeño y su control en naranja 'Valencia' en Veracruz. **Agricultura Técnica en México**, v. 12, n. 2, p. 259-269, 1986.

PERES, N.A.R. **Caracterização patogênica, morfológica, cultural e molecular de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum* spp. em frutas pós-colheita.** 1998. 91f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

PERES, N.A.R.; SOUZA, N.L.; ZITKO, S.E.; TIMMER, L.W. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 6, p. 620-624, 2002.

PERES, N. A. R.; SOUZA, N. L.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 2, p.125-130, 2004.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, n. 8, p. 784-796, 2005.

PERES, N.A.; MACKENZIE, S.J.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, n. 3, p. 345-352, 2008.

PORTO, O. de M. Comparação de programas para controle químico da queda anormal de frutos jovens de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, 1981, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981a. p.481-487.

PORTO, O. de M. Efeito da época e número de aplicações de benomyl no controle da queda anormal de frutos jovens de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, 1981, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981b. p. 569-577.

PORTO, O. de M; ROSSETTI, V.; DORNELLES, C.M.M. Queda de frutos jovens de citrus, causada por *Colletotrichum* sp. no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. p.681-692.

PRATES, H.S., RODRIGUES, J.C.V., NOGUEIRA, N.L. Observações sobre a doença podridão floral na citricultura paulista. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28, 1995, Ilhéus. **Resumos...** Brasília: Fitopatologia Brasileira, 20 supl., p. 296. 1995.

ROBERTO, S.R.; BORGES, A.V. Efeito do estágio de desenvolvimento das flores e da aplicação de fungicidas no controle da podridão floral dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 306-309, 2001.

RODRIGUES, J.C.V.; LEON, T.N. Resistência a benomyl em *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 14, n. 1, p. 357-363, 1993.

ROSSETTI, V.; CARVALHO, M.L.V.; VECHIATO, M.H.; BATISTA, F.A.S. Estudos sobre a queda prematura de frutos cítricos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, 1981, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. p. 641-654.

SCHWARZ, R.E.; KLEIN, E.H.J.; MONSTED, P. Fungal infection of citrus flowers: probable cause of abnormal fruit drop in the Parana mist zone of Misiones, Argentina. In: INTERNATIONAL PLANT PATHOLOGY CONGRESS, 3, 1978, Munich. **Abstract...** Munich: International Plant Pathology Society, 1978. p. 130.

SMITH, C.M. History of benzimidazole use and resistance. In: DELP, C.J. (Ed.). **Fungicide resistance in North American**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 1994. p. 23-24.

SONODA, R.M.; PELOSI, R.R. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* from lesions on citrus blossoms in the Indian River of Florida. **Proceedings of the Florida State Horticulture Society**, Winter Haven, v. 101, p. 36-38, 1988.

SOUZA FILHO, B.F. de; BATISTA, F.A.S.; EMIDIO FILHO, J.; TRINDADE, J. Controle químico da mancha aureolada e da queda dos frutos jovens em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. p. 216-220.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. (Eds.) **Colletotrichum: Biology, Pathology, and Control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 523-537.

TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop of citrus – symptoms, disease cycle and control. **Proceedings of the Florida State Horticulture Society**, Winter Haven, v. 106, p. 102-105, 1993.

TIMMER, L.W.; ZITKO, S.E. Aerial applications of fungicide for control of postbloom fruit drop. **Citrus Industry**, Bartow, v. 73, p. 26-27, 1991.

TIMMER, L.W.; ZITKO, S.E. Timing of fungicide applications for control of postbloom fruit drop citrus in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 8, p. 820-823, 1992.

TIMMER, L.W.; ZITKO, S.E. Relationships of environmental factors and inoculum levels to the incidence of postbloom fruit drop of citrus. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 5, p. 501-504, 1993.

TIMMER, L.W., ZITKO, S.E. Early season indicators of postbloom fruit drop of citrus and the relationship of disease and fruit production. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 10, p. 1017-1020, 1995.

TIMMER, L.W.; ZITKO, S.E. Evaluation of model for prediction of postbloom fruit drop of citrus. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 4, p. 380-383, 1996.

TIMMER, L.W.; BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Eds). **Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interactions**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. p. 300-316.

TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 4, p. 329-334, 1994.

TIMMER, L.W.; ROBERTS, P.D.; CHUNG, K.R. Postbloom fruit drop. In: TIMMER, L.W. **Florida Citrus Pest Management Guide**. Gainesville: University of Florida Cooperative Extension Service, IFAS, 2002. p. 85-88.

UREÑA-PADILLA, A.R.; MITCHELL, D.J.; LEGARD, D.E. Oversummer survival of inoculum for *Colletotrichum* crown rot in buried strawberry crown tissue. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 7, p. 750-754, 2001.

WHEELER, I.E.; KENDALL, S.J.; BUTTERS, J.; HOLLOMON, D. W.; HALL, L. Using allele-specific oligonucleotide probes to characterize benzimidazole resistance in *Rhynchosporium secalis*. **Pesticide Science**, New York, v. 43, n. 3, p. 201-209, 1995.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GEFLAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds). **PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications**. San Diego: CA. Academic Press, 1990. p. 315-322.

YPEMA, H.L.; GOLD, R.E. Kresoxim-methyl: modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 1, p. 4-19, 1999).

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia**, Lawrence, v. 88, n. 1, p. 121-128, 1996.